



## THESIS / THÈSE

### MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

### Effet de la créatine sur la différenciation myocytaire des myoblastes murins C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>

Torez, Emmanuelle

*Award date:*  
2003

[Link to publication](#)

#### General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

#### Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.



---

**FACULTÉS UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX  
NAMUR**

**Faculté des Sciences**

**Effet de la créatine sur la différenciation myocytaire  
des myoblastes murins C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>**

**Mémoire présenté pour l'obtention du grade de  
licencié en Sciences biologiques**

**Emmanuelle TOREZ**

**Juin 2003**

**Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix**  
**FACULTE DES SCIENCES**  
Secrétariat du Département de Biologie  
Rue de Bruxelles 61 - 5000 NAMUR  
Téléphone: + 32(0)81.72.44.18 - Téléfax: + 32(0)81.72.44.20  
E-mail: joelle.jonet@fundp.ac.be - <http://www.fundp.ac.be/fundp.html>

## **Effet de la créatine sur la différenciation myocytaire des myoblastes murins C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>**

TOREZ Emmanuelle

### Résumé

La créatine est reconnue dans le monde médical et sportif depuis plusieurs années pour ses effets bénéfiques au niveau des performances musculaires ainsi que pour sa capacité à augmenter la taille des fibres musculaires, et donc la masse musculaire totale.

Dans le cadre de ce mémoire, nous avons voulu mettre en évidence le(s) effet(s) de la créatine au niveau de la différenciation myocytaire, en utilisant comme modèle cellulaire les myoblastes murins C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>. Après avoir observé une augmentation de la taille des myotubes formés en culture en présence de créatine, nous nous sommes intéressés aux mécanismes sous-jacents pouvant expliquer cet effet. Nous avons mis en évidence une augmentation de la synthèse protéique, un phénomène déjà décrit *in vivo* par plusieurs auteurs. Ensuite, nous avons voulu savoir si l'apport exogène en créatine pouvait influencer l'expression et/ou l'activité de liaison à l'ADN des MRFs et de MEF2A, les deux familles de facteurs de transcription impliquées dans la régulation de la différenciation myogénique.

Enfin, nous nous sommes intéressé à la voie de la PI3K, connue pour être impliquée dans le processus de la différenciation myogénique et pouvant stimuler la synthèse protéique, en utilisant des inhibiteurs tels que le LY294002 ou la wortmaninne.

Mémoire de licence en Sciences Biologiques

Juin 2003

**Promoteur:** Patricia RENARD

Voilà, on touche au but!

Certains diront "déjà" alors que d'autres diront "seulement" mais quoiqu'il en soit, les 4 années d'études et de rencontres en tout genre sont terminées. 4 années qui auront été jalonnées de grands moments de joie, de stress et parfois aussi de peine.

Ces années de dur labeur n'auraient certainement pas été les mêmes sans un tas de gens à qui j'ai enfin l'occasion de dire MERCI.

Tout d'abord, je tiens à remercier Madame Martine Raes de m'avoir accueillie au sein de son laboratoire lors de ces quelques mois.

Ensuite, un énorme merci, et même plusieurs, iront à ma promotrice, Patsy, pour sa gentillesse, sa compréhension, son aide et son suivi mais peut-être plus encore pour son soutien lors des gros coups de déprime des dernières semaines. Sans cela, je n'y serait pas arrivée. Encore merci pour tout.

Je ne peux oublier de saluer tous ceux qui dans le labo ont contribué à mettre une bonne ambiance (quasi) constante mais qui m'ont aussi aidée d'une façon ou d'une autre grâce à "la bonne idée de dernière minute" ou le petit coups de main jamais de refus. Merci à Edouard, Martine, Florence, Sophie, Aline, Cindy, Céline, Sofia, Aurélie, François, Guy, Noëlle, Catherine, Carine et tous les autres aussi.

J'adresserai également un merci tout particulier à Christelle, Valérie et Véronique pour leur bonne humeur et leur infinie patience face à mes 1001 questions du début .....et de la fin aussi.

Pour le côté plus personnel, je tiens à remercier tous les mémorants dont Cindy, Vanessa, Nadine et Muriel ainsi que tous les autres pour tous les bons moments passés ensemble. Je ne les oublierai jamais même s'ils sont nombreux.

Merci à toi Pikatchu (Delphine) pour ton amitié et ton soutien. Nos nombreux "pétages de plomb" en auront étonnés plus d'un. Merci pour tous les fous rires allant jusqu'aux larmes et aux crampes..... et pour les notes de téléphones et gsm revues à la hausse depuis qu'on se connaît. Les blocus n'auraient pas été les mêmes sans toi et on n'aurait peut-être pas tenu le coups.

*Merci à Tortue (Caro D.) pour les longues, très longues soirées de rédaction au labo mais aussi pour sa franche camaraderie et son chaleureux accueil au kot, que j'ai souvent envahi au cours des 2 dernières semaines.*

*Merci aussi à Florence, ma meilleure amie, qui bien que se trouvant à Louvain, n'a jamais manqué une occasion de me soutenir et de me faire rire, et ce, malgré son propre mémoire. C'est ça l'amitié !*

*Enfin, the last one but not the least one, je tiens à remercier de tout mon coeur mes parents de m'avoir permis de faire les études de mon choix et de m'avoir encouragée tout au long de celles-ci, même pendant les blocus où j'étais un peu plus "irritable" que d'habitude. Vous n'avez jamais compter .....les kilomètres (et moi non plus d'ailleurs). Merci aussi à mes grands-parents . Encore merci pour tout et sachez que sans vous, tout ceci n'aurait jamais été possible.*

*Emmanuelle*

## Liste des abréviations

- **Abs.** : Absorbance
- **ADN** : Adénosine Désoxyribonucléique
- **ADP** : Adénosine Di Phosphate
- **AGAT** : Arginine : Glycine Amidino-Transférase
- **APS** : Ammonium Persulphate
- **ATCC** : American Type Culture Collection
- **ATP** : Adénosine Tri Phosphate
- **bHLH** : basic-Helix-Loop-Helix
- **BMP-2** : Bone Morphogenic Protein-2
- **BSA** : Bovinr Serum Albumin
- **CBP** : CREB Binding Protein
- **cdk** : Cyclin-dependent kinase
- **CK** : Créatine Kinase
- **cpm** : coups par minute
- **CREB** : cAMP-Response Element Binding protein
- **CTL** : Contrôle
- **DHG** : Dulbecco's modified eagle's medium + High Glucose
- **DMSO** : Diméthylsulfoxyde
- **DTT** : Dithiotréitol
- **EAT** : Eppendorf Advanced Technology
- **ECL** : Enhanced Chemoluminescent
- **EDTA** : Ethylène Diamine Tétra Acétique
- **EGF** : Epidermal Growth Factor
- **Em.** : Emission
- **FCS** : Fœtal Calf Serum
- **FGF** : Fibroblast Growth Factor
- **g** : Gramme
- **GAMT** : Guanidinoacetate N-Transférase
- **HB** : Hypotonic Buffer
- **HDAC** : Histone Désacétylase
- **HEPES** : 2-[4-(Hydroxyéthyl)-1-Piperazino]-ethan sulfonsaeure
- **HLH** : Helix-Loop-Helix
- **HRP** : Horse Radish Peroxydase
- **HS** : Horse Serum
- **Id** : Inhibitor of Differentiation
- **Ig** : Immunoglobuline
- **IGF** : Insulin-like Growth Factor
- **M** : Molaire
- **mA** : Milliampère
- **MEF** : Myogenic Enhancer Factor
- **MHC** : Myosin Heavy Chain
- **ml** : millilitre
- **mM** : millimolaire
- **MPER** : Mammalian Protein Extraction Reagent
- **MRF** : Myogenic Regulatory Factor
- **Myo D** : Myogenic Determining gene
- **Myo R** : Myogenic Repressor
- **nm** : Nanomètre

- **NP-40** : Nonidet P-40
- **o/n** : Over night
- **p38<sup>MAPK</sup>** : p38 Mitogen Activated Protein Kinase
- **PBS** : Phosphate Buffer Saline
- **PCR** : Polymerase Chain Reaction
- **PDGF** : Platelet Derived Growth Factor
- **PFA** : Paraformaldéhyde
- **pH** : Potentiel Hydrogène
- **Pi** : Phosphate inorganique
- **PIB** : Phosphatase Inhibitor Cocktail
- **PIC** : Protease Inhibitor Cocktail
- **PI3K** : Phosphoinositol 3 kinase
- **PKB** ; Protein Kinase B
- **PNPP** : p-Nitrophenyl Phosphate
- **PPAR** : Peroxysome Proliferator Activated Receptor
- **PRb** : Protéine du Rétinoblastome
- **PVDF** : Polyvynilidene Flouride
- **Re** : Resuspension Buffer
- **RNA** : Ribonucleic Acid
- **Rnase** : Enzyme dégradant les acides ribonucléiques
- **rpm** : Rotation par minute
- **Sa** : Saline Buffer
- **SDS** : Sodium Dodecyl Sulfate
- **SDS-PAGE** : Sodium Dodecyl Sulfate – Polyacrylamide Gel Electrophoresis
- **Shh** : Sonic hedgehog
- **TBP** : TATA Binding Protein
- **TBS** : Tris Buffer Saline
- **TBS-T** : Tris Buffer Saline-Tween 20 0,1%
- **TCA** : Acide trichloroacétique
- **TEMED** : N<sub>9</sub>-N<sub>9</sub>-N'<sub>9</sub>-N'<sub>9</sub>-Tétraméthyl-ethylenediamine
- **TF** : Transcription Factor
- **TGFβ1** : Transforming Growth Factor β1
- **TMB** : Tétra-Méthyl Benzidine
- **TRIS** : Tris Hydroxy Méthyl Aminométhane
- **Tween** : Polyoxyéthylène sorbitan monolaurate
- **μCi** : MicroCurie (10<sup>-6</sup> Curie)
- **μg** : Microgramme (10<sup>-6</sup> gramme)
- **μl** : Microlitre (10<sup>-6</sup> litre)
- **Wnt** : Wingless Integrated

# TABLE DES MATIERES

## INTRODUCTION

<b>1. La créatine .....</b>	<b>1</b>
1.1. Introduction générale.....	1
1.2. Synthèse et transport .....	1
1.3. Voie de dégradation.....	2
1.4. Rôles de la créatine.....	2
1.4.1. Tampon énergétique .....	2
1.4.2. Tampon pH .....	3
1.4.3. Augmentation de la résistance et des performances musculaires .....	3
1.4.4. Effet de la créatine sur la synthèse protéique et sur la taille des fibres musculaires. ....	4
<b>2. La différenciation myogénique .....</b>	<b>5</b>
2.1. Introduction.....	5
2.2. Les facteurs de transcription myogéniques .....	6
2.2.1. Les Myogenic Regulatory Factors ou MRFs.....	6
2.2.1.1. Activation séquentielle des MRFs au cours de la différenciation myogénique.....	7
2.2.1.2. Redondance des MRFs .....	8
2.2.1.3. Régulation des MRFs .....	9
2.2.1.3.1. Régulation négative des MRFs .....	9
2.2.1.3.2. Régulation positive des MRFs .....	10
2.2.2. Les Myocyte Enhancer Factors-2 ou MEF-2.....	11
<b>3. La voie de la PI3K ou Phosphoinositol-3 Kinase .....</b>	<b>11</b>
3.1. La PI3K.....	11
3.2 Implication de la PI3K dans la différenciation myogénique .....	12
<b>4. Objectif.....</b>	<b>14</b>

## RESULTATS ET DISCUSSION

<b>1. Effet de la créatine sur la taille des myotubes .....</b>	<b>15</b>
<b>2. Effet de la créatine sur la synthèse protéique.....</b>	<b>19</b>
<b>3. Effet de la créatine sur l'expression et l'activation transcriptionnelle des MRFs (Myogenic Regulatory Factors) .....</b>	<b>21</b>
3.1. Effet de la créatine sur l'expression et l'activité de liaison à l'ADN de Myf 5 .....	22
3.2. Effet de la créatine sur l'expression et l'activité de liaison à l'ADN de Myo D.....	24
3.3. Effet de la créatine sur l'expression et l'activité de liaison à l'ADN de la Myogénine .....	26



3.4. Effet de la créatine sur l'expression et l'activité de liaison à l'ADN de Myf 6 .....	28
<b><u>4. Effet de la créatine sur l'expression et l'activité de liaison à l'ADN de MEF- 2A (Myocyte Enhancer Factor-2A).....</u></b>	<b>30</b>
<b><u>5. Effet de la créatine sur la voie de la PI-3K (Phosphoinositol-3 kinase) .....</u></b>	<b>32</b>
<b><u>Conclusions et Perspectives.....</u></b>	<b>33</b>

## MATERIELS ET METHODES

<b><u>1. Culture cellulaire .....</u></b>	<b>36</b>
1.1. Culture cellulaire .....	36
1.2. Congélation de cellules.....	37
1.3. Décongélation de cellules .....	37
<b><u>2. Extractions protéiques.....</u></b>	<b>37</b>
<b><u>3. Western blotting .....</u></b>	<b>39</b>
3.1. Principe .....	39
3.2 Préparation des échantillons .....	39
3.3 Préparation des gels et migration .....	40
3.3.1 Préparation des gels.....	40
3.3.2. Migration.....	40
3.4. Transfert ou blotting.....	40
3.5. Révélation de la membrane avec des anticorps .....	41
<b><u>4. Dosage de l'activité de liaison à l'ADN d'un facteur de transcription en plaques multipuits.....</u></b>	<b>42</b>
4.1. Principe .....	42
4.2. Fixation du trappeur double brin dans la plaque multipuits.....	43
4.3. Détection de l'activité de liaison à l'ADN d'un facteur de transcription en plaque 96 puits .....	43
<b><u>5. Etude de la synthèse protéique par incorporation de leucine tritiée .....</u></b>	<b>44</b>
5.1. Incorporation de leucine tritiée .....	44
5.2. Extraction protéique et comptage de la radioactivité.....	45
5.2.1. Extraction protéique .....	45
5.2.2. Comptage de la radioactivité .....	46
<b><u>6. Marquage immunocytochimique.....</u></b>	<b>46</b>

## BIBLIOGRAPHIE

# *Introduction*

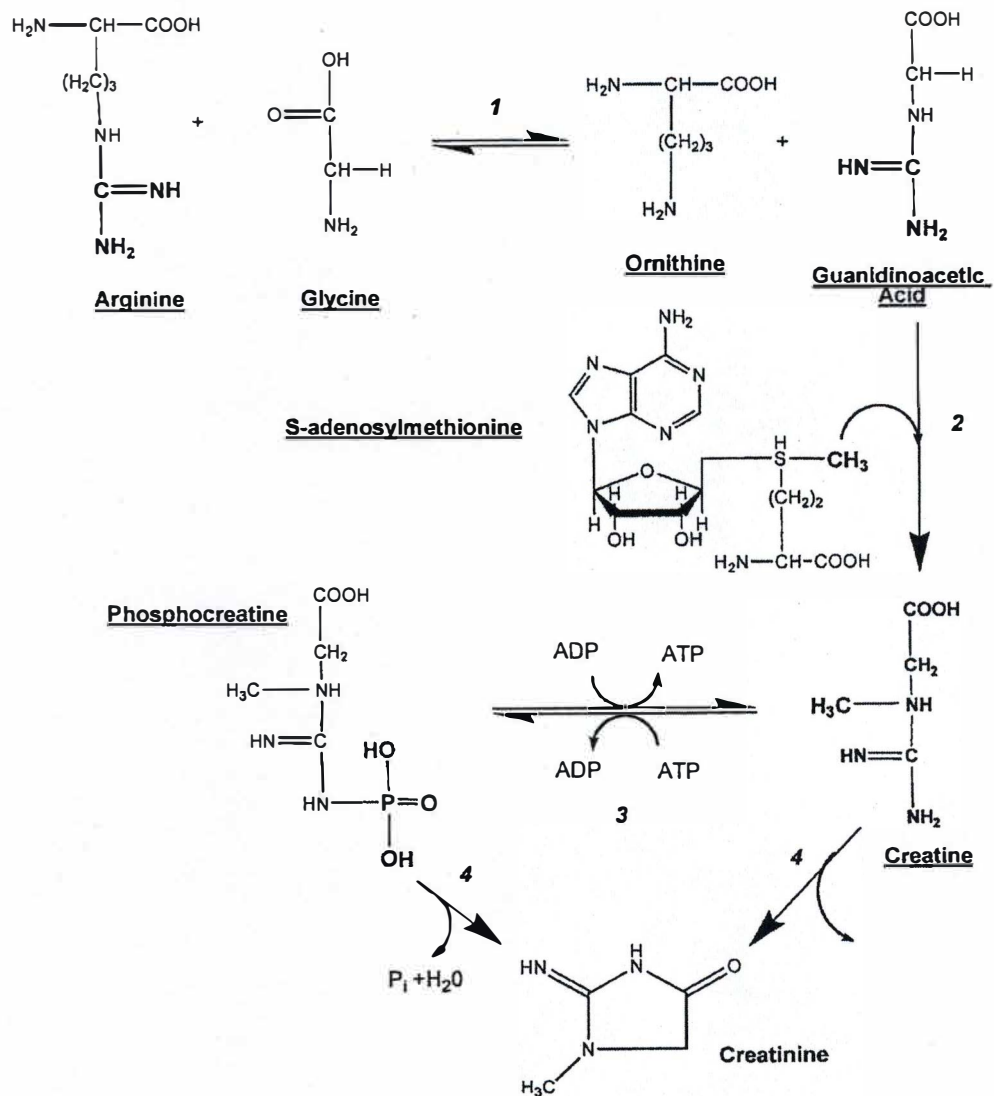


Figure I.1. : Synthèse de la créatine

1 = AGAT

2 = GAMT

3 = Créatine Kinase

4 = Réactions spontanées

(d'après Persky and Brazeau, 2001)

# **1. La créatine**

## **1.1. Introduction générale**

La créatine est une molécule soluble présente naturellement dans l'organisme. Une personne de corpulence moyenne possède un pool de créatine de  $\pm 120$  g, dont 95 % sont stockés au niveau des muscles squelettiques, et le reste dans le foie, le cerveau et le coeur (Kreider, 2003).

La créatine ainsi disponible dans le corps humain peut provenir de deux sources: d'abord une synthèse endogène au niveau du foie et ensuite un apport par le biais de l'alimentation, surtout la viande et le poisson, sachant que l'absorption de celle-ci au niveau de l'intestin sera quasi totale et qu'elle ne sera pas modifiée par les sécrétions acides ou enzymatiques digestives.

Environ les deux tiers de la créatine totale de l'organisme se trouvent sous forme de phosphocréatine, formée grâce à la créatine kinase (CK).

## **1.2. Synthèse et transport**

La créatine synthétisée de façon endogène est produite principalement par le foie et plus accessoirement par les reins et le pancréas à partir de deux acides aminés qui sont l'arginine et la glycine et ce, via deux enzymes, l'arginine:glycine amidino-transférase (ou AGAT) et la S-adenosylmethionine:guanidinoacetate N-transférase (ou GAMT). Un groupe amidine est transféré de l'arginine à la glycine pour former de l'acide guanidinoacétique dans les reins. Cette réaction est suivie par le transfert d'un groupe méthyl de la S-adénosyl méthionine à cet acide pour former de la créatine au niveau du foie (Persky and Brazeau, 2001) (Figure I.1.).

La synthèse de la créatine est régulée notamment par rapport à sa disponibilité dans l'alimentation: si, pour une raison ou une autre, l'apport alimentaire en créatine vient à diminuer, la synthèse comblera ce manque suite à une augmentation de l'activité de l'amidino-transférase hépatique (Ronald et al., 2000).

Ensuite, la créatine, tant l'endogène que celle qui provient de l'alimentation, devient plasmatique après son absorption intestinale. Elle peut alors être absorbée par de nombreux organes mais plus particulièrement par les muscles squelettiques (Figure I.2.).

L'entrée de la créatine dans la cellule se fait alors contre un gradient de concentration, via un transporteur dépendant du sodium. Ce transporteur appartient à la

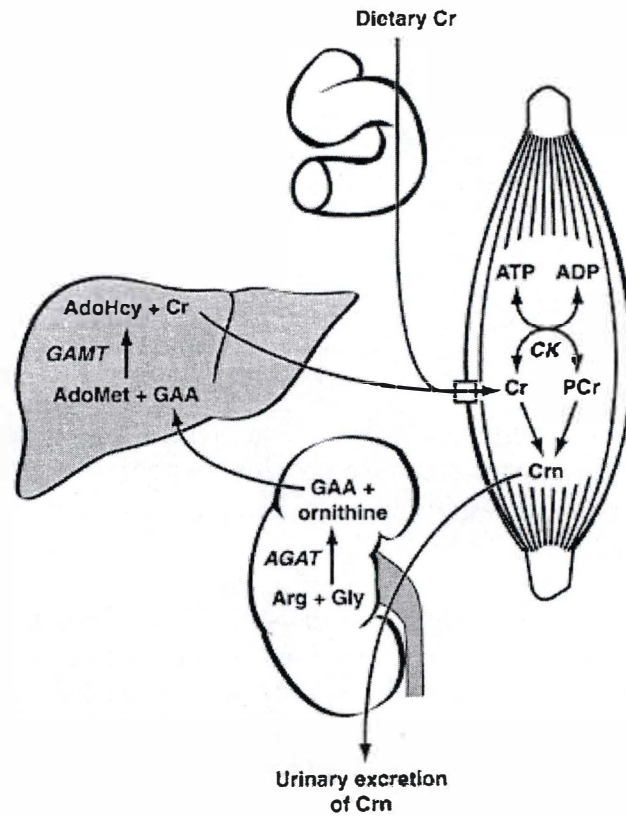


Figure I. 2. : Trajet effectué par la créatine de son absorption intestinale ou sa synthèse endogène à son élimination sous forme de créatinine .  
(Wyss and Kaddurah-Daouk, 2000)

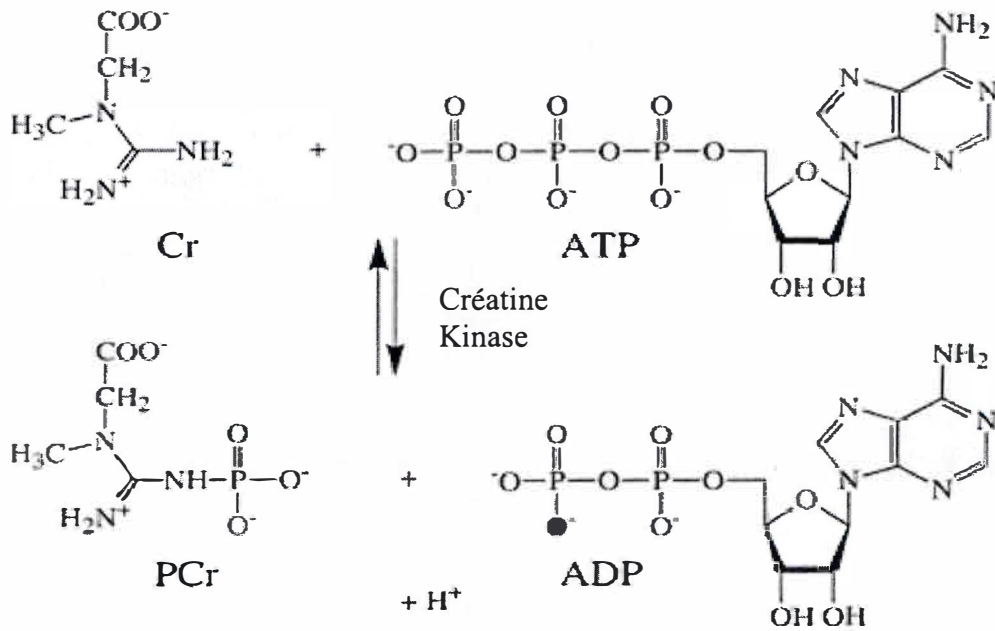


Figure I.3. : Effet de « tampon énergétique » de la créatine  
(d'après Wyss and Kaddurah-Daouk, 2000)

famille des transporteurs de neurotransmetteurs et est semblable à celui de la dopamine et de la taurine. Le transport de la créatine se fait avec une stoechiométrie de  $2 \text{ Na}^+$  pour une molécule de créatine (Wyss and Kaddurah-Daouk, 2000).

Une fois dans la cellule, la créatine est phosphorylée sous l'action de la créatine kinase et devient donc de la phosphocréatine (Figure I.1.). Nous verrons au point 1.4.1. que la phosphocréatine sert de réservoir énergétique en permettant la phosphorylation de l'ADP en ATP (Persky and Brazeau, 2001).

### **1.3. Voie de dégradation**

La créatine et la phosphocréatine peuvent être éliminées de l'organisme grâce à l'excrétion au niveau des reins. En effet, ces deux molécules sont transformées en créatinine par des réactions spontanées et non enzymatiques (Figure I.1.). Environ 1,7% à 2,5% de la créatine totale, soit  $\pm 2$  g par jour, sont excrétés par jour sous forme de créatinine urinaire. En effet, contrairement à la créatine, la créatinine est un mauvais substrat pour le transporteur de la créatine, et elle ne sera donc pas réabsorbée dans la circulation sanguine au niveau des reins (Wyss and Kaddurah-Daouk, 2000).

### **1.4. Rôles de la créatine**

#### **1.4.1. Tampon énergétique**

La seule source d'énergie immédiate utilisée par l'organisme pour les activités intenses de courtes durées telles que le sprint, est l'ATP (ou Adénosine Tri Phosphate). Les contractions musculaires ont pour mécanisme le glissement des myofilaments d'actine entre ceux de myosine avec la transformation d'énergie chimique provenant de l'ATP sarcoplasmique, en énergie mécanique et thermique. Ainsi, au début d'une activité musculaire intense, l'ATP emmagasiné est consommé en environ 6 secondes lors d'une réaction qui le convertit en ADP (ou Adénosine Di Phosphate). Aussi le muscle fait-il appel à d'autres sources d'énergie, qui bout de chaîne, resynthétiseront de nouvelles molécules d'ATP.

Les concentrations intramusculaires en ATP se maintiennent à un niveau élevé (>50 % des taux initiaux) même lorsque l'exercice est épuisant. Il ne semble donc pas que l'ATP soit un facteur limitant d'une performance musculaire. Le premier réservoir d'énergie immédiatement disponible est la phosphocréatine. Lors d'une réaction catalysée par la créatine kinase, la phosphocréatine cède son groupement phosphate à l'ADP et permet ainsi de reformer de l'ATP (Figure I.3.). La phosphocréatine constitue une source d'énergie capable d'assurer la réplétion en ATP nécessaire pour continuer

l'effort pendant encore 5 à 7 secondes (Ronald et al., 2000). On parle ici de la filière anaérobie alactique. A la fin de l'exercice, la récupération de la réserve de phosphocréatine après un exercice est un phénomène rapide. En effet, 5 minutes suffisent à rétablir les concentrations initiales. Toutefois, cette resynthèse n'est effective qu'à travers de la chaîne respiratoire (phase aérobie) responsable de la formation massive d'ATP. Des translocases mitochondriales ramènent la phosphocréatine resynthétisée vers le cytosol (Thiebault, 1998).

On peut donc dire que la créatine, ou plus encore la phosphocréatine, est un réservoir énergétique pour le muscle, ce qui explique qu'elle soit devenue un complément alimentaire de choix chez les sportifs voulant augmenter leurs performances et leur résistance à l'effort (Wyss and Kaddurah-Daouk, 2000). Elle est particulièrement populaire dans le milieu du body-building, du sprint ou du cyclisme, d'autant plus que jusqu'à présent, la créatine n'est pas encore considérée comme un produit dopant, même si cet avis est controversé (Ronald et al., 2000).

D'autre part, des expériences en milieu hospitalier ont montré qu'une supplémentation orale en créatine pouvait augmenter les capacités musculaires de patients atteints de différentes formes de maladies neuromusculaires ou de dystrophies musculaires (Tarnopolsky and Martin, 1999).

#### **1.4.2. Tampon pH**

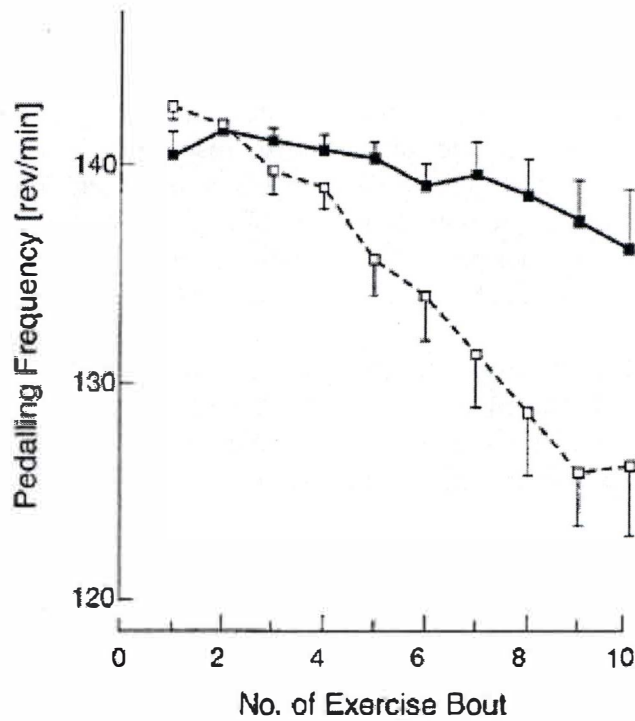
Pendant les contractions musculaires, l'hydrolyse de l'ATP en ADP et Pi s'accompagne de la libération de protons, phénomène qui va contribuer à l'acidification intracellulaire et à l'apparition de crampes. Or, lors de l'hydrolyse de la phosphocréatine en vue de reformer les stocks d'ATP, il y a consommation de ces ions  $H^+$ ; ceci contribue à limiter l'acidose intracellulaire pendant l'exercice et donc au retardement de l'apparition de crampes (Persky and Brazeau, 2001).

#### **1.4.3. Augmentation de la résistance et des performances musculaires**

A l'heure actuelle, la créatine est considérée comme un supplément alimentaire qui permet généralement d'améliorer les performances sportives, sans provoquer d'effets secondaires délétères (Poortmans and Francaux, 1998). En effet, sur environ 500 études réalisées, 70 % ont mis en évidence une amélioration significative des performances musculaires suite à une supplémentation en créatine (Kreider, 2003).

En fonction de la durée de la supplémentation, on peut distinguer 2 types d'études :

- à court terme (moins de 2 mois), on observe une augmentation de la créatine totale contenue dans le muscle, celle-ci représentant la somme de la phosphocréatine et



- Créatine
- Placebo

Figure I.4. : Effet de la créatine sur la résistance à l'effort  
 Des sujets ont été soumis (Créatine) ou non (Placebo)  
 à une supplémentation en créatine pendant 6 jours (30 g/jour).  
 L'influence de cette supplémentation a été évaluée en mesurant  
 la fréquence de pédalage des sujets, au cours de 10 exercices  
 intenses, séparés par une période de repos de 6 secondes.  
 (Wyss and Kaddurah-Daouk, 2000)



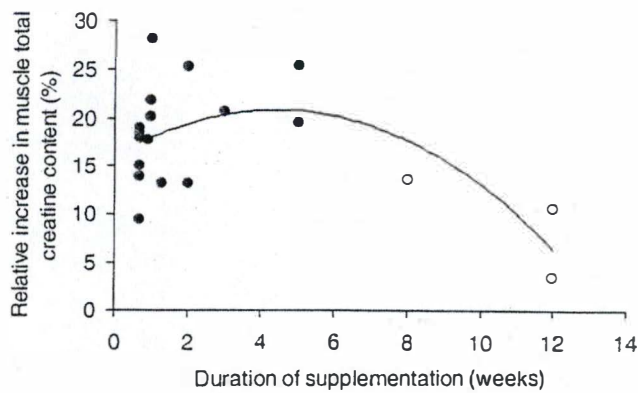


Figure I. 5. : Evolution du contenu en créatine totale musculaire lors d'une expérience de supplémentation en créatine à long terme (12 semaines) réalisée sur des rats.  
La quantité de créatine totale diminue dès la cinquième semaine de l'expérience.  
(Derave and al., 2003)

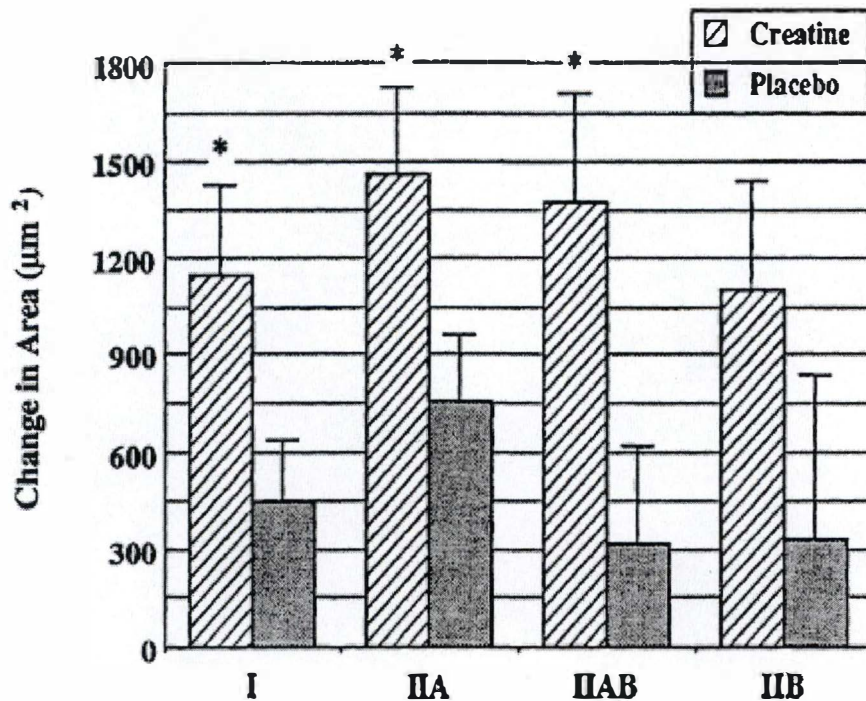


Fig. I.6. : Effet de la créatine sur la taille des fibres musculaires  
Une supplémentation en créatine a été réalisée pendant 12 semaines sur des hommes suivant un entraînement physique, alors qu'un autre groupe (=Placebo) n'a pas reçu cet apport en créatine.  
Les sujets du groupe « Créatine » ont montré une augmentation du diamètre des fibres musculaires, surtout celles de type II.  
(Persky and Brazeau, 2001)

de la créatine libre. Ceci se traduit logiquement par une augmentation des performances musculaires, telles que la force musculaire maximale ou la résistance à la fatigue comme illustré par la figure I.4. Les sujets sains montrant la plus grande augmentation du contenu en créatine totale présentent également le gain le plus élevé au niveau de leurs fonctions musculaires. Des résultats positifs ont aussi été montrés lorsque la supplémentation avait lieu sur des patients atteints de diverses maladies neuromusculaires (Louis et al., 2003) (Figure I.4.).

- à long terme (plus de 2 mois), on a remarqué qu'au-delà d'une dizaine de semaines d'apport en créatine, le taux de phosphocréatine qui était devenu assez élevé au début de la supplémentation (augmentation de 10 à 40 %), commence à diminuer et ce malgré la persistance de l'apport en créatine (Figure I.5.). Chez le rat, cette diminution du taux de phosphocréatine peut être mise en relation avec une diminution du nombre de transporteur à la créatine. Néanmoins, cette relation n'a pas encore été mise en évidence chez l'homme. De plus, rien à l'heure actuelle n'indique que le transporteur de la créatine est bien le facteur limitant ne permettant plus au taux de phosphocréatine d'augmenter (Derave et al., 2003). Malgré cela, il a tout de même été montré par Louis et collaborateurs, qu'après une supplémentation en créatine de plusieurs mois suivie d'une période de « wash-out », chez des enfants atteints de la myopathie de Duchenne, les performances musculaires restaient encore 2 fois plus élevées qu'avant (Louis et al., 2003). L'augmentation des performances musculaires lors d'une supplémentation en créatine à long terme ne peut donc simplement s'expliquer par une augmentation du contenu en phosphocréatine. Il semblerait que la créatine puisse exercer également un effet positif sur les performances musculaires en provoquant une augmentation de la masse musculaire, de l'ordre de 2 kg pour un individu adulte (Francaux, communication personnelle). Au niveau histologique, ceci se traduit par une augmentation de la taille des fibres musculaires, comme décrit par Persky et illustré à la figure I.6. (Persky and Brazeau, 2001). Cette augmentation de la taille des fibres ou de la masse musculaire totale pourrait être liée à une augmentation de la synthèse protéique.

#### **1.4.4. Effet de la créatine sur la synthèse protéique et sur la taille des fibres musculaires.**

Plusieurs études réalisées *in vitro* ont montré que l'apport exogène de créatine pouvait augmenter la synthèse protéique, surtout au niveau de la myosine et de l'actine (Vandenbergh et al., 1997). Ces résultats sont toutefois controversés puisque d'autres études menées *in vitro* ne montrent pas d'effet sur la synthèse protéique, et que des données obtenues *in vivo* montrent au contraire une diminution du catabolisme protéique conjuguée à un statu quo de la synthèse protéique (pour une revue, voir (Persky and Brazeau, 2001).

Le(s) mécanisme(s) par le(s)quel(s) la créatine provoque une augmentation de la quantité de protéines cellulaires reste(nt) encore largement inconnu(s). Lors de son entrée dans la cellule, la créatine provoque une entrée et une rétention d'eau dans celle-ci. Or, l'hyperhydratation cellulaire est connue pour influencer le métabolisme

cellulaire, entre autre en inhibant la protéolyse ou en agissant comme un signal anabolique en stimulant la synthèse protéique (Berneis et al., 1999).

Une hypothèse émise et découlant de ces différentes observations, est qu'une supplémentation en créatine, en provoquant une augmentation de l'eau intracellulaire, induirait l'augmentation de la synthèse protéique en agissant comme un signal anabolique stimulant cette synthèse (Vandenberghe et al., 1997).

L'augmentation de la synthèse protéique en réponse à une supplémentation en créatine pourrait expliquer l'augmentation de taille des fibres musculaires ayant été observée chez des sujets soumis à un tel traitement (Persky and Brazeau, 2001).

Notons toutefois que cette hypothèse est encore controversé, toutes les expériences n'allant pas dans le même sens (Kreider, 2003). L'effet de la créatine sur la taille des fibres musculaires pourrait être lié au processus de différenciation de ces fibres, que nous allons donc introduire au point suivant.

## **2. La différenciation myogénique**

### **2.1. Introduction**

Au cours du développement d'un organisme, mais aussi tout au long de son existence comme par exemple pendant le renouvellement cellulaire suite à une cicatrisation, il existe un processus biologique appelé différenciation cellulaire durant lequel des cellules précurseurs pouvant entrer dans différentes voies de différenciation suite à la perception de signaux, entrent dans une voie de différenciation spécifique et finissent par donner un type cellulaire bien déterminé.

Ces cellules précurseurs pluripotentes ou cellules souches se caractérisent par le fait qu'elles n'expriment aucun caractère de différenciation, mais sont capables de se diviser et bien entendu, de se différencier et donc d'acquérir les marqueurs de leur différenciation tant morphologique que fonctionnelle (Seale et al., 2001). Dans le cadre de ce mémoire, nous nous sommes penchés sur un processus de différenciation cellulaire particulier : la différenciation myogénique ou myogenèse, processus se déroulant en plusieurs étapes.

En effet, dans un premier temps, les cellules souches provenant des somites, structures se trouvant près du tube neural et de la notochorde, donnent des myoblastes qui sont des cellules musculaires précurseurs possédant toujours la capacité de proliférer (Bailey et al., 2001). Ensuite, ces myoblastes vont sortir de façon irréversible du cycle cellulaire au niveau de la phase G0 et devenir des myocytes. Ceux-ci vont alors s'aligner et fusionner au niveau de leur membrane cellulaire, conduisant à la formation de myotubes. Ces myotubes seront donc multinucléés alors que les myoblastes et les myocytes étaient mononucléés.

Néanmoins, il faut remarquer que tous les myocytes ne fusionneront pas en myotubes. En effet, les cellules satellites sont des cellules souches myogéniques postnatales, mononucléées, qui se trouvent dans un état de quiescence entre la lame basale et la membrane plasmique des myofibres (Vierck et al., 2003). Quand celles-ci sont activées, elles prolifèrent et se différencient pour former des myofibres et donc permettre la croissance ou la régénération musculaire. De la même façon, les cellules de réserve sont également mononucléées et quiescentes et peuvent aussi être activées pour proliférer et se différencier, celles-ci ayant conservé leur potentiel myogénique (Yoshida et al., 1998). Dans les modèles de différenciation myogénique *in vitro* (voir point 4.), une proportion non négligeable de cellules de l'ordre 70 % échappe à la différenciation terminale en myotubes et constitue ce que l'on qualifie de "Cellules de réserve", que l'on peut comparer aux cellules satellites.

## **2.2. Les facteurs de transcription myogéniques**

Les facteurs de transcription, généraux ou régulateurs, sont donc des protéines nucléaires qui contrôlent l'expression des gènes pour la prolifération, le développement, la maturation et la formation fonctionnelle de toutes les cellules de l'organisme (Hinoi et al., 2002). Ceux-ci présentent des caractéristiques structurales communes et se composent de 2 domaines: un domaine de liaison à l'ADN qui permet au facteur de transcription de se fixer au niveau d'une séquence ADN spécifique, appelée séquence consensus bien conservée, et un domaine de transactivation qui est nécessaire au déclenchement ou à l'arrêt de la transcription et pouvant être mis en contact avec la machinerie de transcription via des cofacteurs, activateurs ou répresseurs, tels que CBP (CREB Binding Protein) ou p300. Un domaine de régulation peut également être présent et subir des modifications comme par exemple des phosphorylations (ou des déphosphorylations) ou des acétylations.

La myogenèse ou différenciation myogénique est contrôlée par 2 familles de facteurs de transcription, les MRFs (ou Myogenic Regulatory Factors) et les MEFs (ou Myocyte Enhancer Factors) que nous allons détailler ci-dessous.

### **2.2.1. Les Myogenic Regulatory Factors ou MRFs**

Cette famille de facteurs de transcription se compose de 4 membres qui sont Myf 5, Myo D, la myogénine et Myf 6. Ceux-ci agissent à différentes étapes du processus de différenciation en contrôlant l'expression de gènes spécifiques des muscles.

Ces facteurs de transcription présentent un domaine de liaison à l'ADN de type basic Helix-Loop-Helix (bHLH). Ils forment des hétérodimères via des interactions entre les résidus hydrophobes des hélices  $\alpha$  avec les membres de la famille des protéines E qui sont exprimés de façon ubiquiste, (Wei and Paterson, 2001). Le

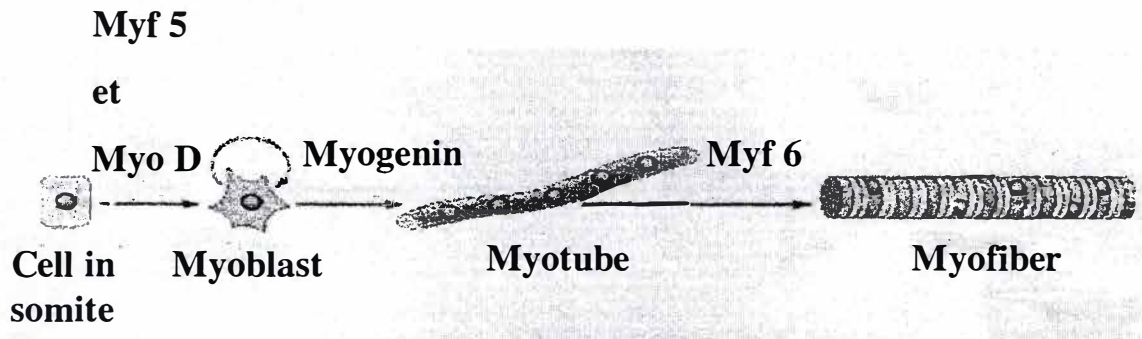


Figure I.7.: Cinétique d'activation des MRFs  
(d'après Rudnicki et al., 1993)

domaine basique quant à lui, médie la liaison de ces facteurs à leur séquence ADN consensus CANNTG, qui est appelée E-Box. Cette E-box est donc reconnue par chacun des 4 MRFs, et se trouve dans le promoteur de différents gènes spécifiques des muscles, tels que celui de créatine kinase musculaire, la Myosin Heavy Chain, la myogénine, .... (Arnold and Winter, 1998).

Les MRFs régulent non seulement la différenciation myogénique naturelle de cellules dont la destinée est de devenir des cellules musculaires, mais la surexpression de chacun des MRFs est capable d'engendrer un phénomène appelé "conversion myogénique" des cellules non-musculaires en cellules myogéniques. Ces cellules deviennent musculaires via l'activation du programme de différenciation myogénique : elles fusionnent et expriment des gènes spécifiques des muscles.

### **2.2.1.1. Activation séquentielle des MRFs au cours de la différenciation myogénique**

L'expression et l'activité transcriptionnelle des différents membres de la famille des MRFs est séquentielle tout au long du processus de différenciation, comme illustré à la figure I.7.

Le premier MRF à être exprimé est Myf 5 et ce, bien avant le début du programme de différenciation, dès que les cellules sont engagées ("committed") dans la voie myogénique. Vient ensuite le tour de Myo D, mais toujours dans des myoblastes en pleine prolifération. Ce n'est que bien plus tard que la myogénine et Myf 6, encore appelé MRF 4 ou Herculine, seront à leur tour exprimés. En effet, la myogénine est exprimée en même temps que la formation des premiers myotubes alors que Myf 6 n'apparaît que plus tard, quand de longs myotubes sont déjà présents et dans les muscles squelettiques adultes (Lassar and Munsterberg, 1994). On distingue donc 2 groupes de MRFs : les facteurs de détermination avec Myf 5 et Myo D et les facteurs de différenciation avec la Myogénine et Myf 6 (Song et al., 1998).

Dans la myogenèse, l'enclenchement du programme de la différenciation myogénique et donc l'expression de Myf 5 et de Myo D dépend de différents signaux perçus par les cellules des somites, tels que des morphogènes comme les Wnt (ou Wingless Integrated) produits au niveau du tube neural ou Shh (ou Sonic hedgehog) issu de la notochorde (Munsterberg et al., 1995). La façon dont ces différents signaux sont intégrés par les cellules des somites n'est pas encore très claire, mais elle conduit à l'expression de Pax3. Cette protéine clef dans le développement des muscles squelettiques est un facteur de transcription qui contrôle notamment l'expression de Myo D (Arnold and Winter, 1998).

Major muscle phenotypes of MRF-knockout mice.*					
Developmental stage	MyoD <sup>-/-</sup>	Myf5 <sup>-/-</sup>	Myf5 <sup>-/-</sup> MyoD <sup>-/-</sup>	Myogenin <sup>-/-</sup>	MRF4 <sup>-/-†</sup>
Myotome before E9.5	Normal	No myocytes No myogenin	–	Anatomically wild-type	Reduced early myotomal myogenesis
Myotome after E10.5	Normal	'Recovering' myotome <sup>‡</sup>	–	Severe differentiation defect	'Recovering' myotome <sup>‡</sup>
Newborn	Grossly normal Increased Myf5	Grossly normal	Few cells Increased fat	Severe differentiation defect	Mainly normal

Table I.1. : Récapitulation des différents types de souris Knockout obtenues pour l'étude de la redondance des MRFs. (Yun and Wold, 1996)

### 2.2.1.2. Redondance des MRFs

Une des meilleures façons de déterminer le ou les rôle(s) d'une protéine est de réaliser, quand ceci est possible, un organisme Knockout pour le gène qui encode cette protéine. Ces expériences ont été réalisées sur des souris pour les différents MRFs et l'ensemble de ces données est synthétisée dans la table I.1., à partir de la revue de Yun et Wold (Yun and Wold, 1996).

Une double mutation nulle de Myo D et de Myf 5 (Myo D <sup>-/-</sup>; Myf 5 <sup>-/-</sup>) ne permet à aucune souris de survivre. En effet, peu de temps après la naissance, ces souriceaux meurent cyanosés. A la dissection, il a été observé qu'aucun muscle squelettique n'était présent, tant au niveau du tronc que des membres. De même, des Northern Blot ne montrent aucune trace détectable d'ARN messagers codant pour des protéines spécifiques des muscles squelettiques telles que la MHC (Myosin Heavy Chain).

De façon tout à fait opposée, une souris Myf 5 <sup>-/-</sup> Myo D <sup>+/-</sup> ne présente aucune anomalie morphologique d'un point de vue de la taille, de la forme ou de la localisation des muscles. Ceci montre qu'un seul allèle fonctionnel de Myo D suffit au bon déroulement de la différenciation myogénique. Il existe donc une certaine redondance au niveau des fonctions de ces 2 premiers MRFs. Une interprétation de ces résultats est que ces MRFs (Myf 5 et Myo D) interviennent bien dans la détermination du nombre et du type de cellules qui vont être engagées dans le processus de myogenèse, conformément à l'appellation de "Facteurs de détermination" qui est octroyée à ces 2 facteurs de transcription (Rudnicki et al., 1993).

D'autres expériences de mutations nulles ont été réalisées et ont contribué à confirmer la différence existant entre les facteurs dits de détermination (Myf 5 et Myo D) et la myogénine, un facteur de différenciation. En effet, une souris au génotype Myogénine <sup>-/-</sup> présente une déficience grave de la différenciation des muscles squelettiques mais possède néanmoins une très grande quantité de précurseurs myoblastiques aux endroits où les muscles auraient dû se former (Yun and Wold, 1996).

Les souris KO pour Myf 6, le plus tardif des MRFs, sont viables et ne présentent pas de défaut de formation des muscles squelettiques (Zhang et al., 1995). Par contre, les auteurs ont observé une forte augmentation de l'expression de la myogénine dans ces souris, ce qui suggère que celle-ci compense l'absence de Myf 6. Comme Myf 6 est exprimé très tardivement durant l'embryogenèse pour devenir vraisemblablement le MRF prédominant dans le muscle squelettique adulte, les résultats de Zhang et collaborateurs suggèrent que Myf 6 contrôle la down-regulation de la myogénine qui survient normalement dans les muscles squelettiques après la naissance.

Alors que les souris déficientes pour Myo D ou Myf 6 ne présentent pas de défaut musculaire, les doubles mutants Myo D <sup>-/-</sup> Myf 6 <sup>-/-</sup> présentent une déficience musculaire grave comparable à celle observée chez les souris déficientes pour la myogénine (Rawls et al., 1998). Ces résultats suggèrent que, si les MRFs sont en partie redondants, la vision de 2 MRFs de détermination redondants (Myf 5 et Myo D) et 2 MRFs de différenciation (Myogénine et Myf 6) partiellement redondants est trop simpliste. Ces 4 facteurs de transcription interviennent de manière subtilement



combinée pour assurer un développement musculaire harmonieux. De plus, la fonction des MRFs dépend non seulement de leur niveau d'expression dont nous venons de parler mais également de toute une série de régulations ultérieures abordées au point suivant.

### **2.2.1.3. Régulation des MRFs**

Une caractéristique commune aux cellules musculaires aussi bien dans la myogenèse développementale que dans les modèles cellulaires *in vitro* est l'expression des MRFs de détermination (Myf 5 et Myo D) dans les cellules myogéniques non différenciées, avant que le programme de différenciation ne soit pas enclenché. L'activité de ces MRFs doit donc être étroitement régulée afin que la myogenèse ne survienne ni trop tôt dans le processus de développement embryonnaire, ni dans des tissus dont la destinée n'est pas musculaire.

L'influence de signaux extérieurs (tant positifs que négatifs provenant de cellules adjacentes) est donc critique pour l'activation temporelle et spatiale des MRFs, et est médiée par des processus intracellulaires tels que, entre autres, des interactions protéiques et des acétylations.

Nous allons aborder brièvement les modes de régulation de l'activité des MRFs qui nous paraissent les plus importants.

#### **2.2.1.3.1. Régulation négative des MRFs**

Plusieurs protéines possédant un domaine de dimérisation de type HLH sont considérées comme des répresseurs de MRFs, soit par interaction directe avec les MRFs, soit de manière indirecte, par exemple en titrant les protéines E (pour une revue voir (Puri and Sartorelli, 2000)).

La protéine Id (Inhibitor of Differentiation) empêche la formation d'un hétérodimère entre Myo D (ou Myf 5) et la protéine E en se liant à cette dernière. La protéine E devient alors incapable de lier l'ADN ou un MRF, ce qui rend impossible la différenciation myogénique. Ceci se passe dans les myoblastes en pleine prolifération où l'activité des MRFs se trouve ainsi bloquée (Wei and Paterson, 2001).

De façon similaire, la protéine Twist exprimée dans le mésoderme, séquestre aussi la protéine E. Elle inhibe également les fonctions de MEF2 et de Myo D par interactions directes.

D'autres protéines, comme Myo R ou mist-1, inhibent la différenciation myogénique en formant des complexes avec les protéines E. Ces complexes se lient aux séquences d'ADN E-box mais sont transcriptionnellement inactifs. Myo R et mist-1 jouent donc un rôle de répresseur transcriptionnel en occupant les E-box à la place des dimères MRF- protéines E.

Un autre mode de répression consiste à séquestrer Myo D dans le cytoplasme. C'est le cas de I-mfa, un autre membre de la famille des bHLH qui empêche la translocation nucléaire de Myo D (Arnold and Winter, 1998). Enfin, en traitant des cellules avec des inhibiteurs de désacétylases, on a montré une augmentation de l'activité transcriptionnelle de Myo D, ceci signifiant que la désacétylation par HDAC (Histone Désacétylase) un effet inhibiteur sur Myo D (Puri and Sartorelli, 2000).

La régulation de l'activité des MRFs doit nécessairement être liée à l'arrêt de la prolifération, puisque la différenciation ne s'enclenche que lorsque les myoblastes sont sortis du cycle cellulaire, en G0. Cette régulation s'opère notamment par l'intermédiaire des cyclines et des cdk (cyclin dependant kinase). En effet, dans les myoblastes en prolifération, un taux élevé de cycline D1 induit une localisation nucléaire de la cdk4. La différenciation myogénique ne pourra donc pas commencer. La cdk4 interagit directement avec l'extrémité C-terminale de Myo D, empêchant de la sorte sa liaison à l'ADN. Inversement, dans les myotubes, le taux plus faible de cycline D1 ne permet pas de maintenir la cdk4 dans le noyau, ce qui libère la répression exercée par la cdk4 sur les fonctions de Myo D (Wei and Paterson, 2001).

On peut donc dire que la régulation négative des MRFs et par conséquent de la différenciation myogénique, se fait soit via des interactions protéine-protéine visant à inactiver ou à séquestrer un MRF ou une protéine associée, soit par des modifications post-traductionnelles comme des désacétylations ou encore par des molécules empêchant les cellules de sortir du cycle cellulaire et donc de se différencier.

Notons que le dialogue entre le cycle cellulaire et les MRFs est bidirectionnel puisque l'activité de Myo D contribue à arrêter le cycle cellulaire en induisant l'expression de p21 (Guo et al., 1995) et en inhibant la phosphorylation de pRb (protéine du rétinoblastome) (Gu et al., 1993).

#### **2.2.1.3.2. Régulation positive des MRFs**

Une fois liés à leur séquence consensus, les MRFs interagissent avec des facteurs de transcription généraux tels que TFIID, qui contient la TBP (TATA binding protein), qui peuvent stabiliser la liaison des MRFs à leur séquence consensus E-box et favoriser ainsi leur activité transcriptionnelle.

Des modifications post-traductionnelles comme les acétylations servent également de régulations positives, celles-ci permettant un remodelage de la chromatine et une activation de la transcription dépendante de Myo D (McKinsey et al., 2001).

L'activité transcriptionnelle des MRFs est largement augmentée grâce à leur interaction directe avec les MEFs, la deuxième famille de facteurs de transcription myogénique, peuvent se lier aux complexes MRF-Protéine E de façon à augmenter le niveau d'activation transcriptionnelle de ces MRFs.

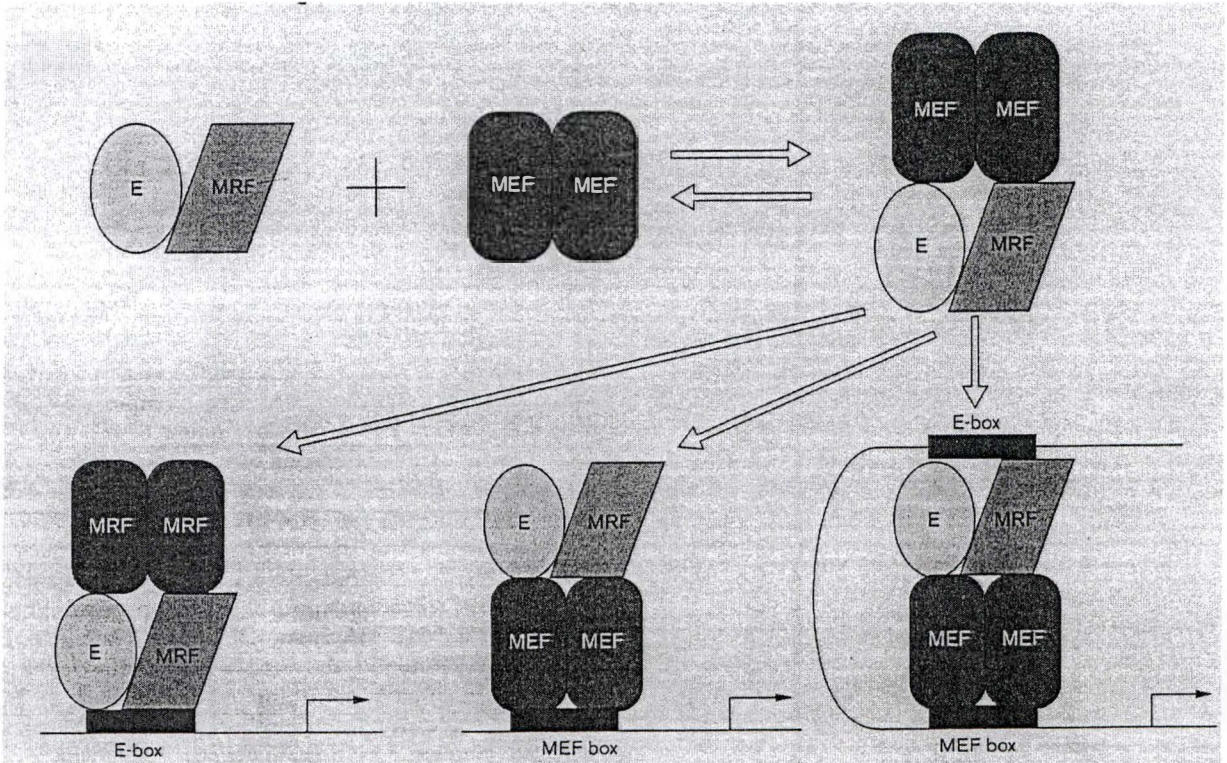


Figure I. 8. : Représentation des différents types d'interaction possibles entre les MEF-2 et les MRFs.  
(Yun and Wold, 1996)

### **2.2.2. Les Myocyte Enhancer Factors-2 ou MEF-2**

La seconde famille de facteurs de transcription qui intervient dans le processus de la différenciation myogénique comporte 4 membres : MEF-2 A, B, C, D. Ces facteurs de transcription forment des homodimères et peuvent participer à la différenciation myogénique de 2 manières :

- En se liant à leur séquence consensus riche en A et T, appelée MEF-box. C'est grâce à une interaction avec un hétérodimère MRF-protéine E qu'ils vont permettre la transcription du gène sous la dépendance de ce promoteur.
- En interagissant avec un hétérodimère MRF-protéine E lui-même lié à sa séquence consensus de type E-box. Bien que la présence de l'hétérodimère MRF-protéine E seul suffise à déclencher la transcription du gène en aval, la présence de MEF-2 augmente fortement la transcription.

Un modèle d'interactions physiques entre les MEF-2, les MRFs et l'ADN est proposé à la figure I. 8. (Yun and Wold, 1996).

Les MEFs sont donc intrinsèquement des facteurs de transcription beaucoup moins puissants que les MRFs, ce qui explique que leur surexpression ne puisse pas à elle seule déclencher un processus de "conversion myogénique" (voir point 2.3.1.1.), contrairement aux MRFs.

Comme c'est le cas pour les MRFs, les MEF-2 sont également régulés par un processus d'acétylation/désacétylation (Naya and Olson, 1999).

## **3. La voie de la PI3K ou Phosphoinositol-3 Kinase**

Comme nous le verrons plus loin, nos résultats nous ont amenés à nous intéresser à la PI3K. C'est pourquoi nous allons, dans le paragraphes suivant introduire cette voie de transduction du signal et son implication dans la différenciation myogénique.

### **3.1. La PI3K**

Les PI3Ks sont une famille de kinases lipidiques qui se caractérisent par leur capacité de phosphoryler le groupe 3'-OH inositol des phospholipides. Ce sont des hétérodimères formés d'une sous-unité catalytique de 110 kDa (p110) et d'une sous-unité régulatrice de 85 (p85) ou 55 kDa.

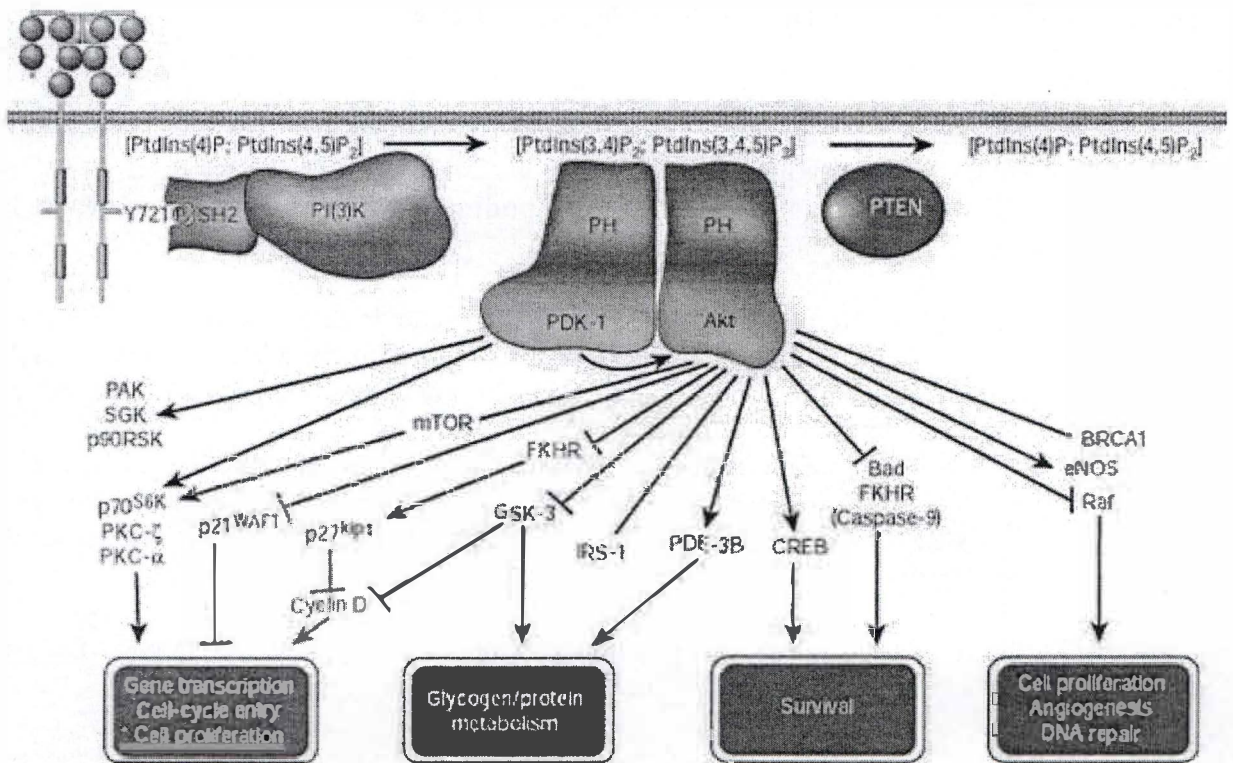


Figure I. 9. : Activation de la voie de la PI3K  
(Blume-Jensen and Hunter, 2001)

Les PI3Ks peuvent être activées en réponse à des ligands tels que le PDGF (Platelet Derived Growth Factor), l'insuline ou l'EGF (Epidermal Growth Factor) qui se lient à leur récepteur de type tyrosine kinase. La fixation du ligand entraîne une autophosphorylation du récepteur au niveau de résidus tyrosines se trouvant du côté intracellulaire. Ceci donne lieu au recrutement de la PI3K par l'intermédiaire des domaines SH2 de la sous-unité régulatrice. Cette interaction entraîne une activation allostérique de la sous-unité catalytique.

L'activation de la PI3K conduit à la production de PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> et PtdIns(3,4)P<sub>2</sub>. Ces polyphosphoinositides se lient notamment au domaine "pleckstrin-homology" (PH) d'au moins 2 protéines : la 3'-phosphoinositide-dependent-kinase (PDK-1) et Akt/protein B. Le recrutement de ces 2 protéines au niveau du feuillet interne de la membrane plasmique conduit à leur activation, comme schématisé à la figure I.9.

La PDK-1 phosphoryle et active plusieurs substrats, dont la protéine Akt, mais aussi la protéine p70<sup>S6K</sup>, une protéine impliquée dans l'initiation de la synthèse protéique (Blume and Jensen, 2001).

Comme l'illustre la figure I.9., la PI3K et ses effecteurs participent à de multiples réponses cellulaires telles que la synthèse protéique, la synthèse de glycogène, la croissance cellulaire, l'apoptose, l'angiogenèse,.....(Brazil and Hemmings, 2001).

### **3.2 Implication de la PI3K dans la différenciation myogénique**

Alors que la plupart des facteurs de croissance tels que le bFGF ou le TGFβ1 sont des inhibiteurs de la différenciation myogénique, la situation est différente pour l'IGF (Insulin-like Growth Factor). L'IGF-1 peut stimuler la prolifération des myoblastes aussi bien que leur différenciation, mais ces effets opposés sont séparés dans le temps. En effet, dans les myoblastes en prolifération, l'IGF-1 augmente l'expression de protéines permettant la progression du cycle cellulaire. Par contre, lorsque les myoblastes sont sortis du cycle cellulaire, l'IGF-1 induit une augmentation de l'expression et de l'activation des différents MRFs, permettant la différenciation (Tamir and Bengal, 2000). L'action de l'IGF-1 sur la prolifération myoblastique serait médiée par la voie des p38MAPK (Cuenda et al., 1999) alors que son effet sur la différenciation dépend essentiellement de la PI3K. En effet, l'utilisation d'inhibiteurs de la PI3K comme la wortmanine ou le LY294002 inhibe la différenciation de myoblastes L6A1 en culture induit par l'IGF-1 (Kaliman et al., 1998) ; (Coolican et al., 1997). De même, l'expression de la myogénine induite dans les cellules différenciées en présence d'IGF-1 est inhibée par les inhibiteurs de la PI3K (Xu and Wu, 2000).

Les résultats de ces expériences ont montré des effets négatifs des inhibiteurs de la PI3K à différents stades de la différenciation myogénique, tant au niveau morphologique que biochimique. En effet, contrairement à ce que l'on observe lors d'une différenciation *in vitro* sans ces inhibiteurs, l'ajout de LY294002 ou de wortmanine permet l'alignement mais pas la fusion des myocytes, empêchant ainsi la formation de myotubes multinucléés. Au niveau biochimique, ces inhibiteurs empêchent

la régulation négative de la protéine Id qui va donc s'accumuler, empêchant l'activation transcriptionnelle de Myo D et de Myf 5. Le LY294002 et la wortmanine inhibent aussi la sortie du cycle cellulaire des myoblastes, étape indispensable au déclenchement de la différenciation myogénique (Kaliman et al., 1996).

La PI3K joue également un rôle dans la différenciation des myoblastes en culture lorsque celle-ci est induite par un appauvrissement du milieu en sérum, ce qui correspond au modèle cellulaire utilisé dans notre travail (voir point 1.1. du Matériels & Méthodes). En effet, une forme constitutivement active de la PI3K déclenche la différenciation des myoblastes en culture, alors que l'inhibition de la PI3K endogène par le LY294002 inhibe la formation de myotubes normalement induite par un appauvrissement en sérum (Li et al., 2000).

Signalons que les cellules C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> utilisées comme modèle dans le cadre de ce mémoire produisent et sécrètent de l'IGF dès le début de la différenciation, quand le milieu de culture a été appauvri en sérum, ce qui explique que les myotubes apparaissent un peu plus tard dans le cas d'une différenciation induite par un appauvrissement en sérum par rapport à une différenciation induite par l'IGF-1 (Xu and Wu, 2000).

La suite de la cascade de transduction du signal de la PI3K impliquée dans le processus de la différenciation myogénique porte encore à controverse. Néanmoins, il semble accepté que les effets de la PI3K sur la différenciation soient médiés par Akt (ou PKB). Un des derniers modèles proposé suggère que la PI3K augmente le niveau d'expression de la myogénine via Akt (Sumitani et al., 2002).

## 4. Objectif

Dans cette introduction, (voir point 1.4.4.), nous avons expliqué qu'une supplémentation en créatine pouvait augmenter la taille des fibres musculaires ou encore, la masse musculaire totale. On peut imaginer que cette augmentation de la taille des myofibres provienne d'un effet de la créatine sur la prolifération des myoblastes avant la fusion en myotubes et/ou d'un effet de la créatine sur la différenciation myogénique.

Cependant, il est connu que la croissance des myofibres se déroule en deux processus distincts: l'hyperplasie, ou augmentation du nombre, et l'hypertrophie, ou augmentation de la taille. Chez la plupart des mammifères, l'hyperplasie des myofibres est associée au développement embryonnaire alors que l'hypertrophie est associée à une croissance musculaire postnatale. Le nombre de fibres musculaires est en effet fixé à la naissance et la croissance des muscles est donc due à une hypertrophie des myofibres existantes (Vierck et al., 2003). On peut donc penser qu'une supplémentation en créatine chez des adultes sportifs qui se traduit par une hypertrophie des fibres musculaires, provient d'un effet de cette supplémentation sur la différenciation plutôt que sur la prolifération. Ceci explique donc pourquoi nous étudions, dans le cadre de ce mémoire, l'effet de la créatine sur la différenciation et non sur la prolifération.

Pour aborder cette problématique, nous allons utiliser un modèle cellulaire, les myoblastes murins C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> (ATCC # CRL-1772) fréquemment utilisé dans les études visant à expliquer les mécanismes tant moléculaires que cellulaires de la différenciation myogénique (Puri et al., 1997); (Grimaldi et al., 1997); (Andreucci et al., 2002).

Ces cellules gardent leur pleine capacité proliférative tant que celles-ci restent à un faible niveau de densité, et dans un milieu de culture riche en sérum (10 % de sérum de veau foetal). Pour enclencher le processus différenciation myogénique, on laisse les myoblastes proliférer jusqu'à atteindre 85-90 % de confluence et on appauvrit fortement le milieu de culture en sérum (1 % de sérum de cheval) (voir point 1.1. du Matériels et Méthodes). En faisant ceci, et comme décrit au point 2.1., on passe d'une culture de myoblastes mononucléés à une culture de myotubes multinucléés près desquels se trouvent des cellules de réserve.

Le but de ce mémoire est donc, dans un premier temps, de caractériser le(s) effet(s) de la créatine sur le modèle de différenciation *in vitro*, les myoblastes murins C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>, en terme :

- de morphologie
- de synthèse protéique
- d'expression des facteurs de transcription myogéniques (par western blot)
- d'activité de liaison à l'ADN des facteurs de transcription myogéniques via des dosages colorimétriques Trans AM.

Dans un second temps, nous essaierons de caractériser les voies qui médient les effets de la créatine sur certains de ces paramètres, notamment via l'utilisation d'inhibiteurs de ces voies.



## *Résultats et discussion*

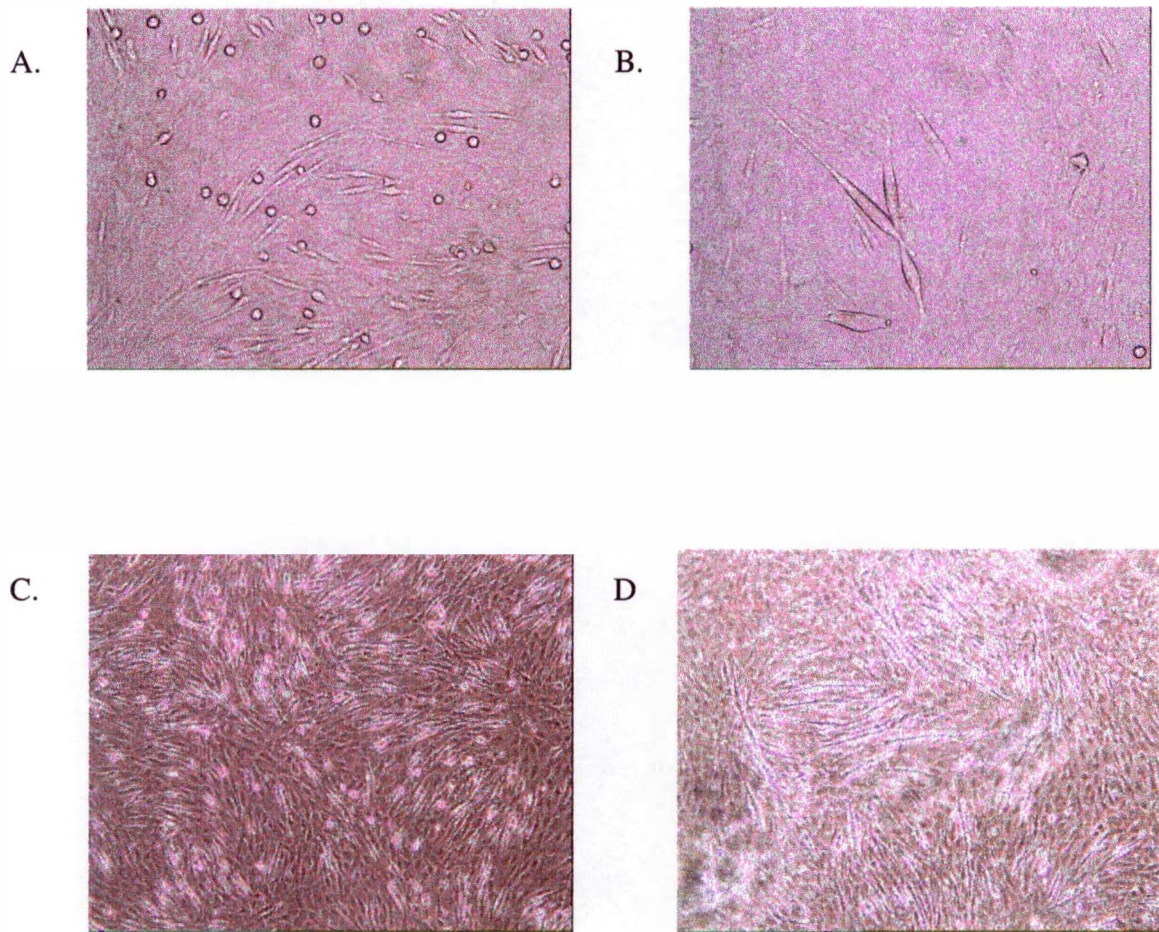
## 1. Effet de la créatine sur la taille des myotubes

La créatine est connue pour avoir un effet positif sur l'augmentation de la masse musculaire ainsi que sur les performances musculaires, ce qui explique qu'elle soit couramment utilisée dans le milieu sportif et/ou médical.

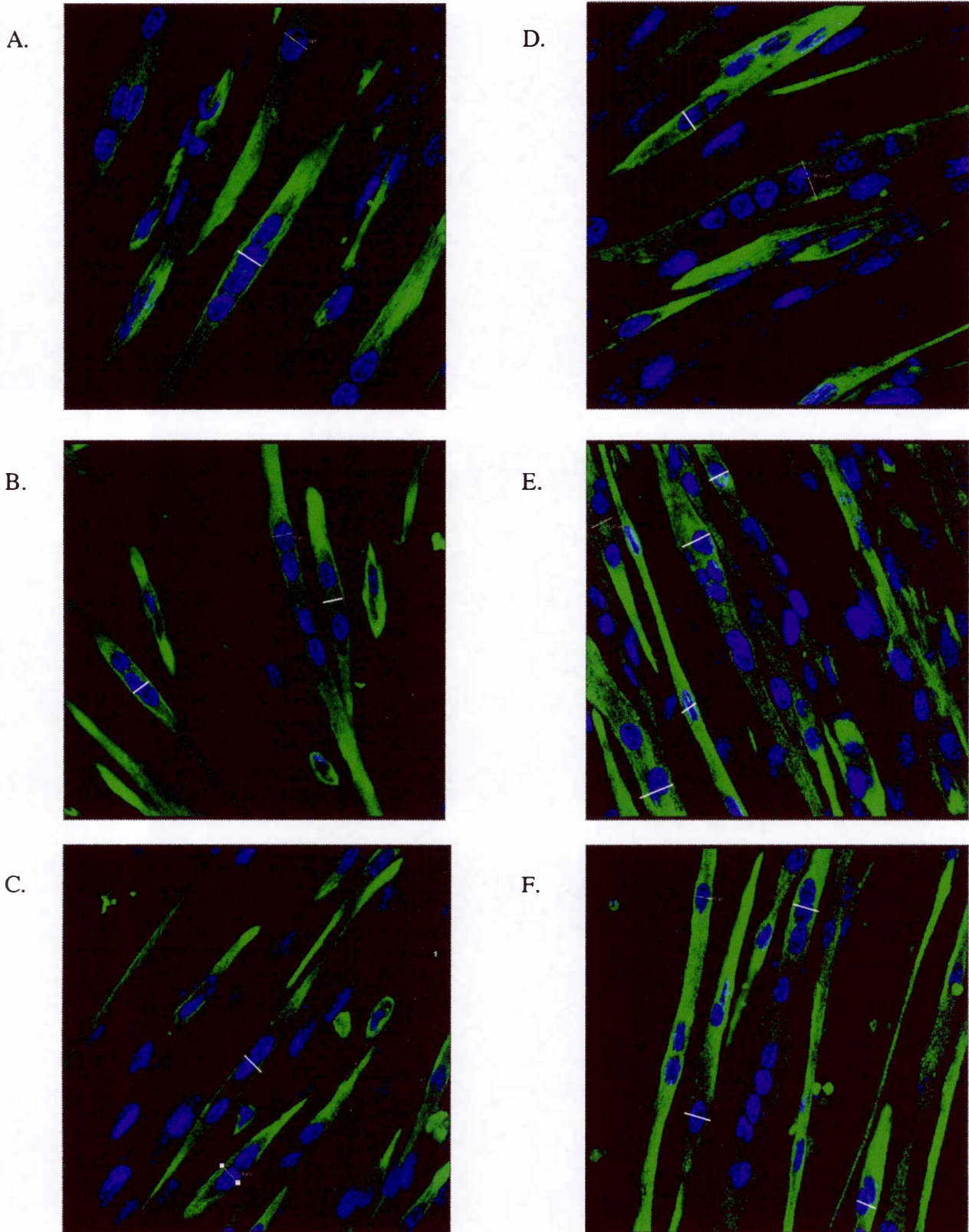
Dans le cadre de ce mémoire, nous avons étudié quels effets la créatine pouvait avoir sur la différenciation myogénique. Afin d'aborder cette problématique, nous avons utilisé un modèle cellulaire de myoblastes murins C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>, dont on peut facilement induire la différenciation myogénique en permettant à ces cellules d'atteindre la confluence et en appauvrissant le milieu de culture en sérum (voir Point 1.1. de Matériels & Méthodes). La différenciation des cellules C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> se marque par l'apparition de myotubes dès le premier jour qui suit l'appauvrissement en sérum.

Au cours d'une première expérience, nous avons comparé la morphologie des cellules mises en condition de différenciation (confluence et 1 % de sérum de cheval) avec ou sans 5 mM de créatine. A différents temps au cours du processus de différenciation, qui s'accompagne d'un fréquent du milieu de culture, nous avons observé des myotubes plus nombreux mais surtout plus gros dans la condition de culture où se trouvait la créatine. (**Figure II. 1.**)

Nous avons voulu objectiver ces observations en mesurant la largeur maximale des myotubes grâce au logiciel de mesure associé au microscope confocal. Pour ce faire, les cellules C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> ont été cultivées et différenciées en présence ou non de 5 mM de créatine, sur des lamelles couvre-objets placées dans des plaques 24 puits. Afin de réaliser ces mesures, il fallait marquer la membrane cellulaire des myotubes. Après quelques tentatives infructueuses, notamment avec des anticorps anti-transferrine, nous avons utilisé des anticorps anti-Annexine II. Ceux-ci marquent bien le contour des myotubes mais peu ou pas celui des myocytes, comme le montre la **figure II. 2.**



**Figure II. 1. : Micrographies en contraste de phase de cellules  $C_2C_{12}$  au deuxième jour (A. et B.) ou au troisième jour (C. et D.) de la différenciation myogénique, cultivées en absence (A. et C.) ou en présence (B. et D.) de 5 mM de créatine. Le milieu de culture et la créatine sont renouvelés tous les 2 jours. (Grossissement 40x en A et B; 10x en C et D)**

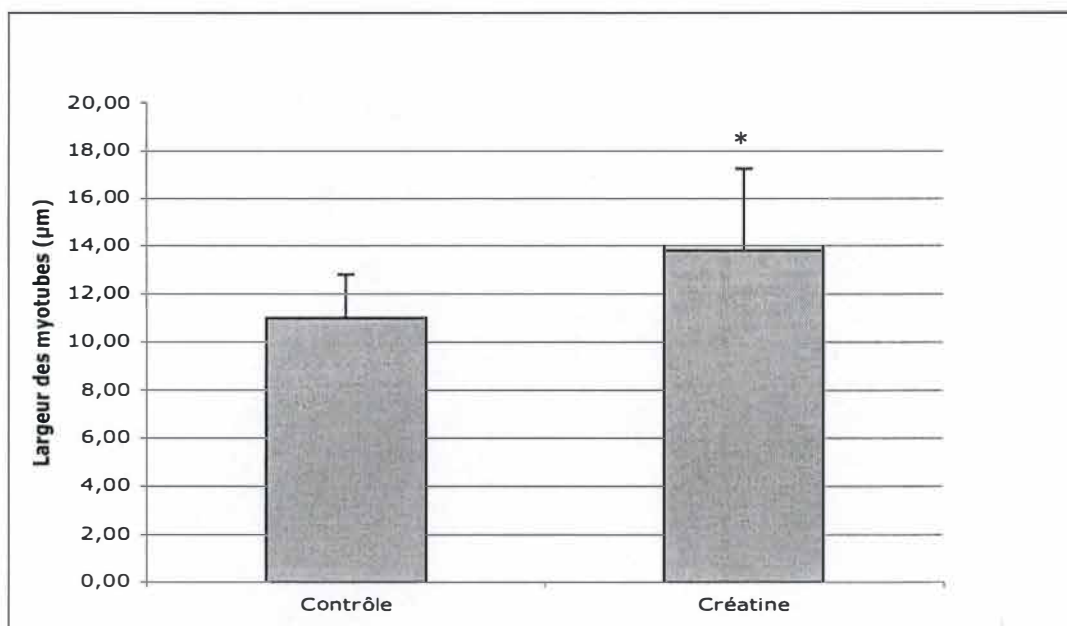


**Figure II. 2. : Effet de la créatine sur la largeur myotubes.**

Les cellules ont été différenciées sur des couvre-objet en absence (A, B, C) ou en présence (D, E, F) de 5 mM de créatine. Après 6 jours, elles ont été fixées et analysées en immunofluorescence par microscopie confocale grâce à un anticorps anti-annexine II (vert). Les noyaux ont été marqués par la sonde TO-PRO3 (rouge).  
(Grossissement 40 x)

Sur chaque lamelle, 8 champs ont été choisis aléatoirement et la largeur maximale de chaque myotube a été mesurée. Pour chaque condition, 3 champs sont montrés à la **figure II. 2**.

La **figure II. 3**. présente la moyenne de toutes ces mesures. Les résultats obtenus montrent qu'il y a une différence de taille entre les myotubes cultivés en absence ou en présence de 5 mM de créatine. En effet, alors que la moyenne des largeurs des myotubes obtenus en condition sans créatine est de 11,02  $\mu\text{m}$ , celle des myotubes obtenus en condition 5 mM de créatine est de 13,82  $\mu\text{m}$ . Cette différence qui représente une augmentation de 25 % est significative suivant un test t de Student (p-value = 0,036)



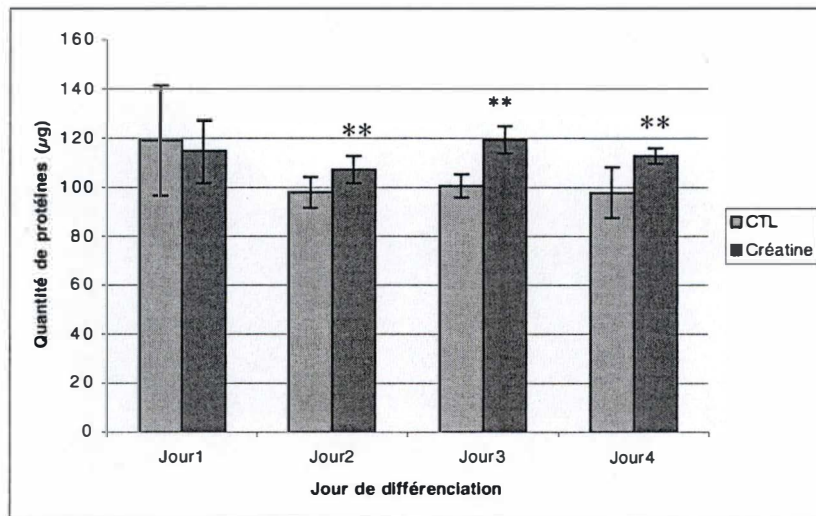
**Figure II. 3. : Effet de la créatine (5 mM) sur la largeur des myotubes**  
Quantification des résultats présentés à la **figure II. 2**.

Découvrir quels étaient les mécanismes sous-jacents à l'augmentation de la taille des myotubes obtenus en présence de créatine dans le milieu de culture fut l'étape suivante de ce mémoire. Une des possibilités était que la créatine pouvait avoir un effet stimulant sur la synthèse protéique, comme l'a décrit Vandenberghe à la suite d'une étude portant sur des femmes ne pratiquant pas d'exercice physique (Vandenberghe et al., 1997).

## 2. Effet de la créatine sur la synthèse protéique

Afin de tester cette hypothèse, nous avons dosé la quantité de protéines totales des cellules C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> aux jours 1, 2, 3 et 4 de la différenciation myogénique, en présence ou non de 5 mM de créatine.

La **figure II. 4.** montre qu'en présence de créatine, la quantité de protéines totales est plus élevée après 2, 3 et 4 jours de différenciation. Ces différences sont hautement significatives suivant un test t de Student.

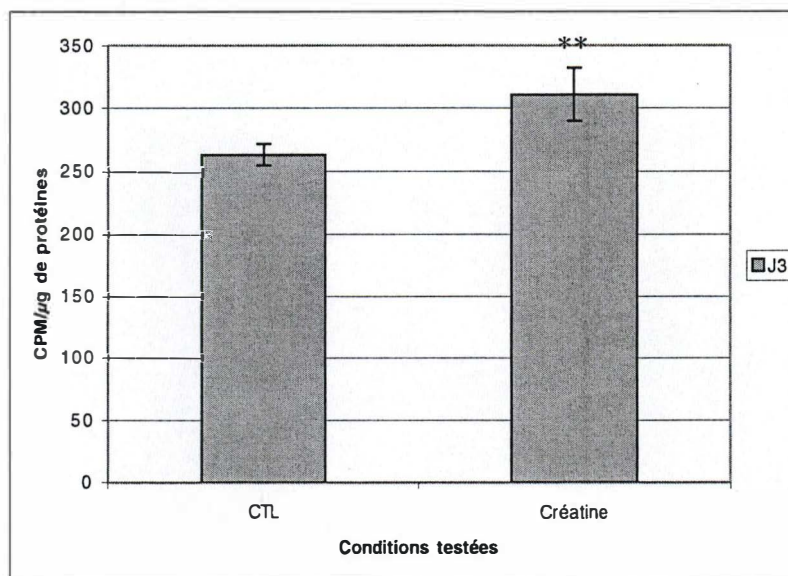


**Figure II. 4. : Evolution de la quantité de protéines au cours de la différenciation myogénique avec ou sans créatine (CTL).** Un dosage de protéines selon la méthode de Bradford a été réalisé après une extraction protéique totale au MPER, comme décrit au point 2. du Matériels & Méthodes. Chaque valeur représente la moyenne de 4 mesures indépendantes  $\pm$  1 écart-type. (\*\* =  $p < 0,01$  par t de Student)

La différence la plus importante se marque après 3 jours de différenciation, où la quantité de protéines totales augmente de 18% en présence de créatine par rapport au contrôle.

Afin de déterminer si cette augmentation de la quantité de protéines reflète une augmentation de la synthèse de protéines ou une diminution de la dégradation, nous avons réalisé un test d'incorporation de leucine tritiée. Cet acide aminé radioactif a été ajouté à raison de 1  $\mu$ Ci/ ml dans le milieu de culture dès le début du programme de différenciation (J0, soit le jour où les cellules confluentes sont placées dans du milieu DHG+ 1% sérum de cheval). Après 3 jours de différenciation, les cellules ont été lysées et la radioactivité incorporée a été mesurée, ainsi que le contenu total en protéines, par la méthode de Bradford.

Les résultats présentés à la **figure II. 5.** indiquent clairement que la créatine induit une augmentation de la synthèse des protéines puisqu'on observe une augmentation de 18% de l'incorporation de l'incorporation de leucine tritiée par rapport à la quantité totale de protéines.



**Figure II. 5: Effet de la créatine sur la synthèse de protéines par les cellules C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> différenciées pendant 3 jours.**

Les cellules C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> ont été différenciées en présence ou en absence de 5 mM de créatine dans du milieu de culture contenant de la leucine tritiée.

Le milieu de culture a été renouvelé tous les deux jours.

(\*\* =  $p < 0,01$  par t de Student)

Ceci concorde avec les données de Persky et Brazeau (2001) qui ont mis en évidence un effet de la créatine sur la synthèse protéique chez des jeunes hommes. Ceci est également cohérent avec l'augmentation de la masse musculaire observée chez les sportifs qui absorbent un supplément de créatine.

Au vu de ces différents résultats, nous pouvons donc conclure qu'une supplémentation en créatine, sur des cellules C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> en culture, a un effet positif ou stimulant sur la synthèse protéique, au cours de la différenciation myogénique.

### **3. Effet de la créatine sur l'expression et l'activation transcriptionnelle des MRFs (Myogenic Regulatory Factors)**

Un des autres impacts que pourrait avoir la créatine et qui pourrait expliquer l'augmentation de la taille des myotubes formés en culture, est un effet stimulant sur l'expression et/ou sur l'activation des MRFs. En effet, le processus de la différenciation myogénique et de formation des myotubes est contrôlé par l'activation séquentielle de facteurs de transcription comme décrit au point 2.3.3. de l'Introduction. On peut donc imaginer qu'une surexpression ou une augmentation de l'activité transcriptionnelle de l'un ou l'autre de ces facteurs myogéniques puisse conduire au phénotype observé.

Nous avons testé cette hypothèse en étudiant tant l'expression, via western blot, que l'activité de liaison à l'ADN de ces facteurs, via les dosages colorimétriques en plaques multipuits (ou Trans AM) mis au point l'année dernière dans le cadre du mémoire de Christelle Plennevaux. Ceci a été réalisé au cours d'une cinétique de différenciation de 8 jours en présence et en absence de créatine, ainsi que sur des cellules contrôles en pleine prolifération (Pro.) et des cellules confluentes (J0). Tout au long de ce travail, ce jour J0 correspondra également au jour où les cellules C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> devenues confluentes, sont mises en présence d'un milieu de culture pauvre en sérum, contenant ou non de la créatine ou toute autre molécule dont on veut tester les effets sur la différenciation myogénique.

Pour les western blot, et ce pour chacune des conditions testées, 20 µg d'extraits protéiques nucléaires ont été chargés sur des gels de polyacrylamide 12 % comme décrit au point 3.3. du Matériels & Méthodes. La charge de protéines a été contrôlée grâce à l'immunodétection de l'histone H1. Les résultats ont alors été quantifiés par une mesure de la densité optique des bandes correspondantes. Ceux-ci sont finalement exprimés sous forme d'un rapport de densités optiques entre les bandes de la protéine d'intérêt et la bande correspondant à l'histone H1. Ceci nous permet d'évaluer l'effet de la créatine sur l'expression des MRFs.

En ce qui concerne l'effet de la créatine sur l'activité de liaison à l'ADN des MRFs, nous avons utilisé le dosage colorimétrique Trans AM. Pratiquement, et comme décrit de façon plus détaillée aux points 4.2. et 4.3. du Matériels & Méthodes, nous avons incubé 10 µg d'extraits protéiques nucléaires en présence du trappeur d'ADN double brin contenant la séquence consensus CANNTG reconnue par les 4 MRFs, fixé dans des plaques 96 puits. La fixation éventuelle d'un facteur de transcription à cette séquence consensus est mise en évidence via une reconnaissance anticorps spécifique suivie d'une réaction colorimétrique. Notons dès à présent qu'il ne faut pas comparer l'intensité des signaux obtenus pour les différents dosages, ceux-ci pouvant varier en fonction de l'anticorps utilisé.



### **3.1. Effet de la créatine sur l'expression et l'activité de liaison à l'ADN de Myf 5**

Comme expliqué dans l'introduction de ce mémoire, le facteur de transcription Myf 5, membre de la famille des MRFs, est exprimé au tout début du programme de la différenciation myogénique, dès que les cellules sont déterminées vers la voie myogénique.

Le western blot montré à la **figure II. 6. A.** confirme cette cinétique d'expression puisque Myf 5 est exprimé dans les cellules C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> en prolifération (Pro) et au Jour 0, quand les cellules sont confluentes, et diminue assez rapidement par la suite.

Après avoir réalisé une quantification de ce western blot, les résultats obtenus ne montrent aucun effet de la supplémentation en créatine sur le niveau d'expression de Myf 5 (**Figure II. 6. B.**).

La **figure II. 6. C.** présente le dosage colorimétrique de l'activité de liaison à l'ADN de Myf 5, qui est parallèle au profil d'expression de Myf 5. En effet, l'intensité des signaux est maximale pour les cellules en prolifération (Pro), confluentes (J0) et en début de différenciation (J1). Cette activité de liaison à l'ADN diminue par la suite. Néanmoins, comme dans le cas du western blot, aucun effet de la créatine n'a pu être mis en évidence. (**Figure II. 6. C.**)

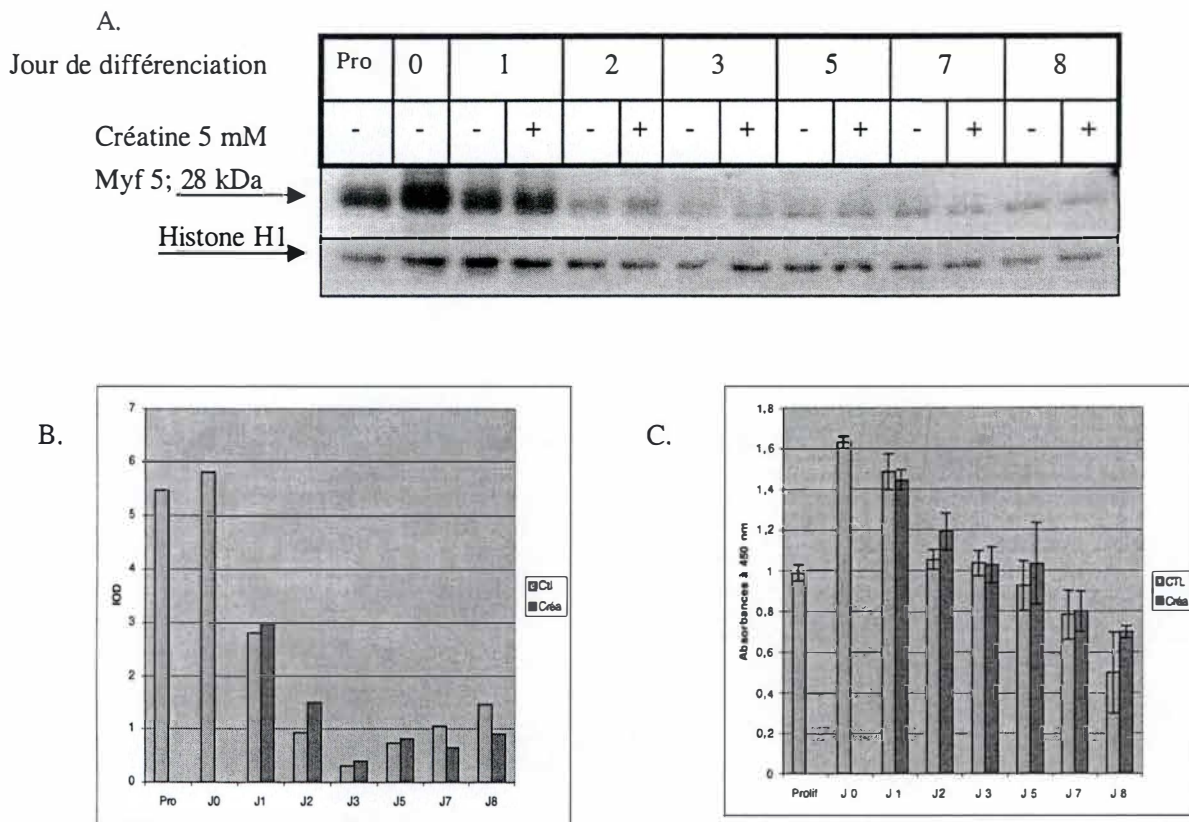


Figure II. 6. : Effet de la créatine sur l'expression (A. et B.) et sur l'activité de liaison à l'ADN (C.) de Myf 5 au cours du processus de la différenciation myogénique.

Les cellules  $C_2C_{12}$  à confluence ont été différenciées en absence (CTL) ou en présence de 5 mM de créatine. Des extraits protéiques nucléaires ont été réalisés après 0 (J0), 1, 2, 3, 5, 7 et 8 jours de traitement, avec un renouvellement du milieu de culture tous les 2 jours. Comme contrôle, des extraits protéiques nucléaires ont également été réalisés à partir de cellules non différenciées, en prolifération (Pro).

A. : Western blot réalisé à partir de 20  $\mu$ g de protéines nucléaires. L'expression de Myf 5 est détectée grâce à l'anticorps anti-Myf 5 (Santa-Cruz, SC-302) et celle de l'histone H1 (contrôle de charge) grâce à l'anticorps anti-Histone H1 (Santa-Cruz, SC-8030).

B. : Quantification du western blot présenté en A. L'intégration de la densité optique (IOD) des différentes bandes a été mesurée par le logiciel Totallab (Amersham Pharmacia Biotech). Les résultats sont exprimés sous forme d'un rapport entre les IOD correspondant à Myf 5 et les IOD des bandes de H1.

C. : Activité de liaison de Myf 5 à l'ADN, évaluée par dosage colorimétrique Trans AM. Chaque point représente la moyenne  $\pm$  l'écart-type de 3 mesures réalisées à partir des mêmes extraits nucléaires que ceux utilisés en A.

### **3.2. Effet de la créatine sur l'expression et l'activité de liaison à l'ADN de Myo D**

Suivant la cinétique d'apparition des différents MRFs au cours du processus de la différenciation myocytaire, nous nous sommes ensuite intéressés au cas de Myo D. En effet, ce facteur de transcription est présent au début du programme de différenciation mais un peu plus tard que Myf 5 comme Rudnicki l'avait décrit (Rudnicki et al., 1993).

Le western blot réalisé avec les mêmes extraits protéiques que pour Myf 5 confirme le profil d'expression attendu pour Myo D avec une expression plus importante en début qu'en fin de différenciation (**Figure II. 7. A.**). Ce profil se reflète également au niveau du dosage de l'activité de liaison à l'ADN présenté à la **figure II. 7. C.**

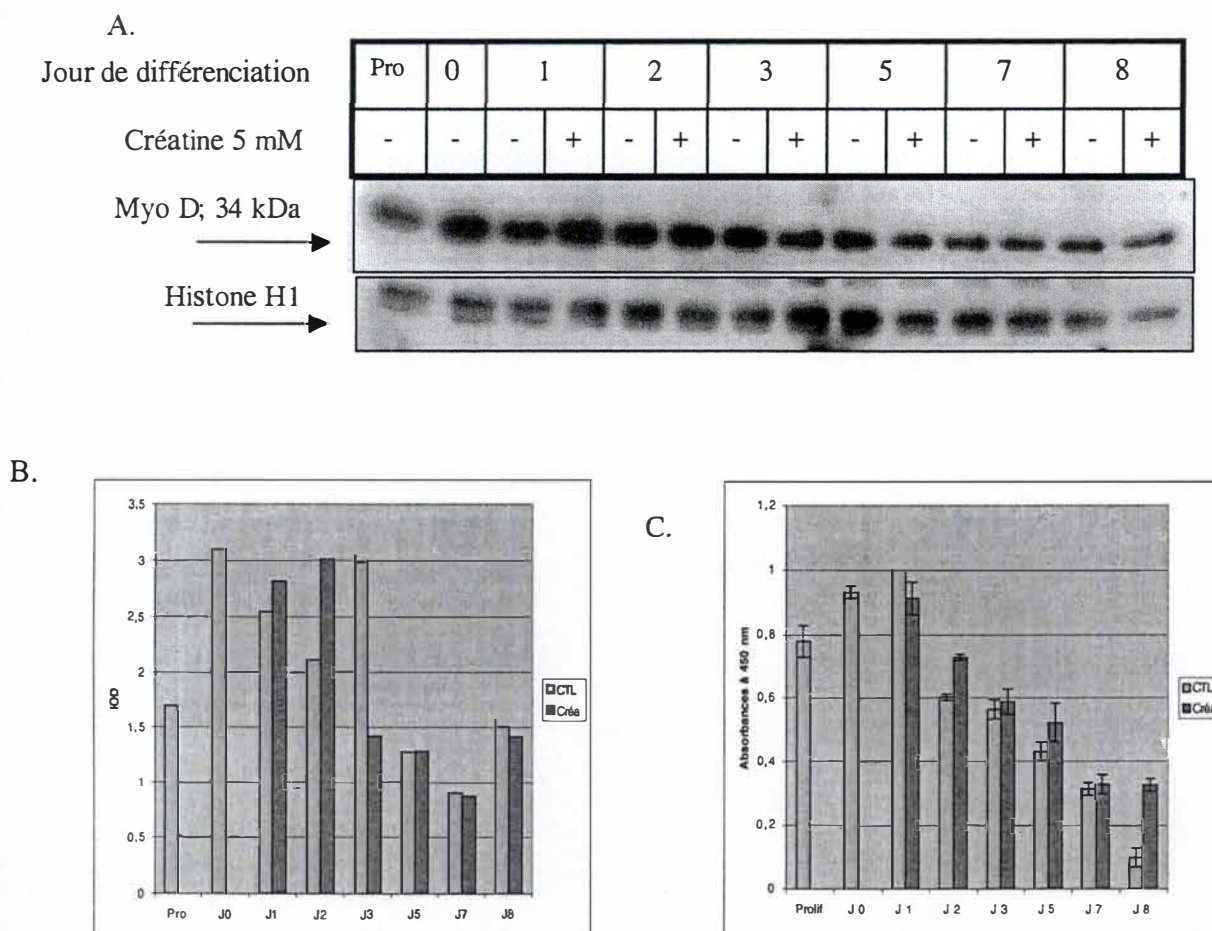
Après quantification du western blot, on observe bien que l'expression de Myo D est la plus importante en début de différenciation (du Jour 0 au Jour 3) et diminue ensuite mais de façon moins rapide que Myf 5. Seule la situation au Jour 2 de la différenciation myogénique présente un effet positif de la créatine sur l'expression de Myo D avec une augmentation de l'expression de 36 % (**Figure II. 7. B.**).

Cette expérience a été répétée à partir d'autres extraits nucléaires préparés dans les mêmes conditions (résultats non montrés) et a montré une augmentation de l'expression de Myo D de 13 % après 2 jours de différenciation en présence de créatine. Bien que cet effet positif de la créatine sur l'expression de Myo D au jour 2, soit relativement faible, il se marque également sur l'activité de liaison à l'ADN au jour 2 (+ 23 %) (**Figure II. 7. C.**)

De manière surprenante, la quantification du western blot indique une diminution de plus de 50 % de l'expression de MyoD induite par la créatine au 3<sup>ème</sup> jour de différenciation. Ce résultat nous paraît suspect car :

- a) il survient alors que nous avons observé l'effet opposé 1 jour plus tôt.
- b) le film d'autoradiographie montre un noircissement dans cette piste au niveau du contrôle de charge.

Comme ce résultat n'a pas été reproduit lors d'une nouvelle expérience réalisée avec d'autres extraits cellulaires préparés dans les mêmes conditions (résultats non montrés), nous estimons que cette diminution de l'expression de Myo D observée en présence de créatine au Jour 3 de la différenciation est un artéfact expérimental.



**Figure II. 7. : Effet de la créatine sur l'expression (A. et B.) et sur l'activité de liaison à l'ADN (C.) de Myo D au cours du processus de la différenciation myogénique.**

Les cellules C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> à confluence ont été différenciées en absence (CTL) ou en présence de 5 mM de créatine. Des extraits protéiques nucléaires ont été réalisés après 0 (J0), 1, 2, 3, 5, 7 et 8 jours de traitement, avec un renouvellement du milieu de culture tous les 2 jours. Comme contrôle, des extraits protéiques nucléaires ont également été réalisés à partir de cellules non différenciées, en prolifération (Pro).

**A. :** Western blot réalisé à partir de 20 µg de protéines nucléaires. L'expression de Myo D est détectée grâce à l'anticorps anti-Myo D (Santa-Cruz, SC-304) et celle de l'histone H1 (contrôle de charge) grâce à l'anticorps anti-Histone H1 (Santa-Cruz, SC-8030).

**B. :** Quantification du western blot présenté en A. L'intégration de la densité optique (IOD) des différentes bandes a été mesurée par le logiciel Totallab (Amersham Pharmacia Biotech). Les résultats sont exprimés sous forme d'un rapport entre les IOD correspondant à Myo D et les IOD des bandes de H1.

**C. :** Activité de liaison de Myo D à l'ADN, évaluée par dosage colorimétrique Trans AM. Chaque point représente la moyenne ± l'écart-type de 3 mesures réalisées à partir des mêmes extraits nucléaires que ceux utilisés en A.

Au jour 8, enfin, la créatine semble influencer favorablement l'activité de liaison à l'ADN de Myo D (**Figure II.7.C.**). En effet, à ce stade de la différenciation, l'activité de liaison à l'ADN de Myo D est 3 fois plus élevée en condition avec créatine par rapport au contrôle. Ces résultats suggèrent que la créatine pourrait avoir un effet positif en deux temps sur l'activité de MyoD. Un premier effet, modéré, s'observe tant sur l'expression que sur l'activité de liaison à l'ADN après 2 jours de différenciation, ce qui correspond à l'apparition des premiers myotubes. D'un point de vue cinétique, cet effet pourrait donc être en relation avec l'augmentation de la taille des myotubes observée en présence de créatine.

Dans un second temps, la créatine exerce également un effet positif beaucoup plus tardif, au jour 8 de la différenciation. Nous observons 3 fois plus d'activité de liaison à l'ADN dans les cellules traitées avec la créatine, mais pas de différence d'expression de MyoD. Le fait que nous observions un effet sur l'activité de liaison à l'ADN et pas sur l'expression de Myo D n'est pas étonnant, compte tenu des multiples niveaux de régulation qui s'exercent sur les MRFs (voir point 2.2.1.4. de l'Introduction). On peut penser que la créatine permettrait de prolonger l'activité de liaison à l'ADN de Myo D au cours du programme de différenciation. Cette donnée doit toutefois être considérée avec prudence car nous n'avons pas eu l'occasion de reproduire cette expérience

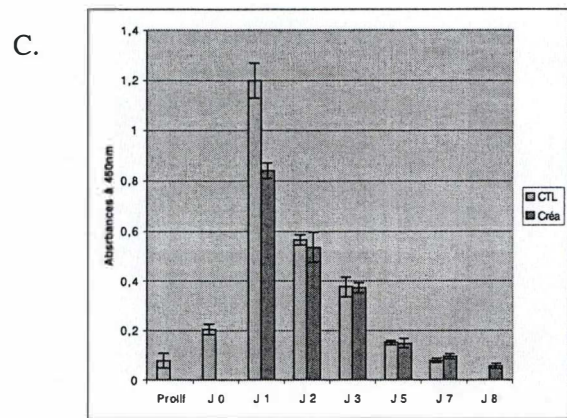
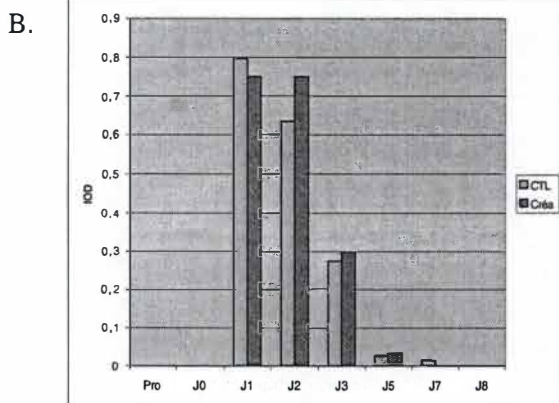
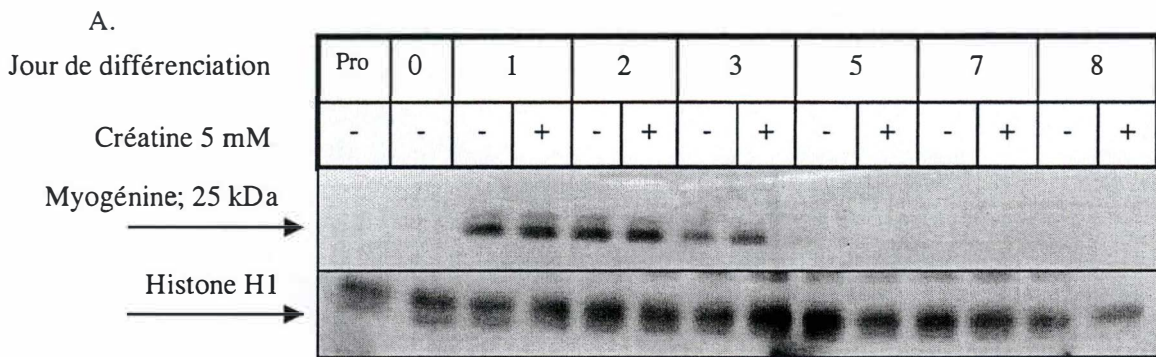
### **3.3. Effet de la créatine sur l'expression et l'activité de liaison à l'ADN de la Myogénine**

Après l'analyse de facteurs de transcription dits de détermination (Myf 5 et Myo D), nous avons étudié le profil d'expression du premier facteur de transcription dit de différenciation, la myogénine.

Celle-ci apparaît normalement en même temps que les premiers myotubes (Song et al., 1998). Dans les conditions *in vitro* étudiées, ceux-ci apparaissent, bien qu'encore de taille réduite, dès le deuxième jour de la présence du milieu de différenciation (J1) (DHG + 1 % HS). Le western blot montre effectivement que la myogénine n'est pas exprimée dans les cellules en prolifération ni dans les cellules à confluence. Son expression est maximale aux jours 1 et 2 de la différenciation myogénique, et diminue ensuite rapidement pour retourner à un niveau presque nul dès le Jour 5 du processus (**Figure II. 8. A.**).

La quantification de ce western ne montre aucun effet de la créatine sur l'expression de la myogénine au cours de la différenciation myogénique (**Figure II. 8. B.**).

Les résultats du dosage colorimétrique présenté à la **figure II. 8. C.** montrent que l'activité de liaison à l'ADN de la myogénine est maximale au Jour 1 de la différenciation, au moment où les premiers myotubes apparaissent, ce qui correspond à ce que l'on sait de l'activation séquentielle des MRFs (Song et al., 1998).



**Figure II. 8. : Effet de la créatine sur l'expression (A. et B.) et sur l'activité de liaison à l'ADN (C.) de la myogénine au cours du processus de la différenciation myogénique.**

Les cellules C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> à confluence ont été différenciées en absence (CTL) ou en présence de 5 mM de créatine. Des extraits protéiques nucléaires ont été réalisés après 0 (J0), 1, 2, 3, 5, 7 et 8 jours de traitement, avec un renouvellement du milieu de culture tous les 2 jours. Comme contrôle, des extraits protéiques nucléaires ont également été réalisés à partir de cellules non différenciées, en prolifération (Pro).

A. : Western blot réalisé à partir de 20 µg de protéines nucléaires. L'expression de la myogénine est détectée grâce à l'anticorps anti-myogénine (Pharmingen, 556358) et celle de l'histone H1 (contrôle de charge) grâce à l'anticorps anti-Histone H1 (Santa-Cruz, SC-8030).

B. : Quantification du western blot présenté en A. L'intégration de la densité optique (IOD) des différentes bandes a été mesurée par le logiciel Totallab (Amersham Pharmacia Biotech). Les résultats sont exprimés sous forme d'un rapport entre les IOD correspondant à la myogénine et les IOD des bandes de H1.

C. : Activité de liaison de la myogénine à l'ADN, évaluée par dosage colorimétrique Trans AM. Chaque point représente la moyenne ± l'écart-type de 3 mesures réalisées à partir des mêmes extraits nucléaires que ceux utilisés en A.

La liaison à l'ADN de la myogénine diminue ensuite rapidement, montrant un bon parallélisme avec le profil d'expression mis en évidence par le western blot présenté à la **figure II. 8. A**. Tout comme pour l'expression de ce facteur de transcription, aucun effet positif de la créatine n'a pu être détecté sur son activité de liaison à l'ADN.

Notons encore qu'une activité de liaison à la séquence consensus est détectée dans des extraits protéiques nucléaires provenant de cellules en prolifération, J0 et J8 alors que nous ne détectons pas d'expression du facteur myogénique dans les mêmes conditions. Nous pouvons interpréter cette observation par le fait que le dosage colorimétrique Trans AM est plus sensible que la technique du western blot.

### **3.4. Effet de la créatine sur l'expression et l'activité de liaison à l'ADN de Myf 6**

Le dernier membre de la famille des MRFs à être exprimé durant la différenciation myogénique est le facteur de transcription Myf 6, également appelé MRF 4 ou Herculine. En effet, celui-ci n'apparaît qu'après Myf 5, Myo D et la myogénine, après la formation des myotubes (Montarras et al., 1991).

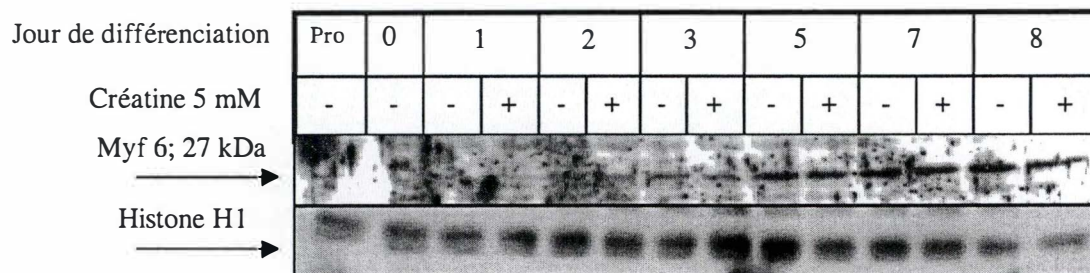
Le western blot présenté à la **figure II. 9. A** confirme l'expression tardive de Myf 6 (à partir du Jour 3 de la différenciation) dans les extraits protéiques nucléaires de cellules C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>. La mauvaise qualité du western blot obtenu pour Myf 6 peut être attribuée à un problème d'anticorps, mais celui qui a été utilisé est le seul dont nous disposons. Afin d'améliorer la qualité du western blot, nous avons recommencé plusieurs fois la manipulation en faisant varier la dilution de l'anticorps ou en centrifugeant celui-ci avant utilisation, mais sans succès.

La quantification de ce western blot est présentée à la **figure II. 9. B**, mais nous ne lui attribuons qu'une valeur indicative à cause de la mauvaise qualité du western blot. Aucune tendance générale ne se dégage de cette quantification. En effet, nous observons une alternance au niveau de l'effet de la créatine, tantôt positif (J1 et 7), tantôt négatif (J3 et 8). Ces résultats peuvent, du moins en partie, être expliqués par la mauvaise qualité du western blot.

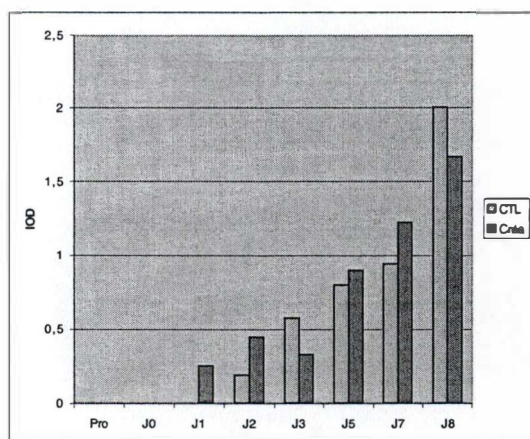
Au vu des résultats du dosage colorimétrique réalisé et montré à la **figure II. 9. C**, le profil d'activité de liaison à l'ADN attendu pour Myf 6 est confirmé, avec une valeur maximale au Jour 3 de la différenciation, quand de longs myotubes sont déjà présents.

Dans ce cas-ci, nous observons que la créatine exerce un effet positif aux Jours 5 et 8 de la différenciation. En effet, les résultats du dosage pour ces 2 jours montrent une absorbance, et donc une activité de liaison à l'ADN, passant du simple au double entre la condition contrôle (CTL) et la condition avec créatine (Créa). Notons encore que le résultat obtenu pour le Jour 7 est surprenant car, alors qu'un effet positif de la créatine est observé avant et après ce jour, on ne détecte plus d'effet de la créatine pour ce jour. Cette observation pourrait être due à un artefact.

A.



B.



C.

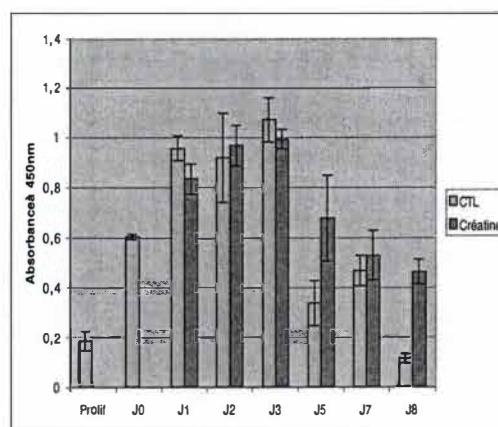


Figure II. 9. : **Effet de la créatine sur l'expression (A. et B.) et sur l'activité de liaison à l'ADN (C.) de Myf 6 au cours du processus de la différenciation myogénique.**

Les cellules  $C_2C_{12}$  à confluence ont été différenciées en absence (CTL) ou en présence de 5 mM de créatine. Des extraits protéiques nucléaires ont été réalisés après 0 (J0), 1, 2, 3, 5, 7 et 8 jours de traitement, avec un renouvellement du milieu de culture tous les 2 jours. Comme contrôle, des extraits protéiques nucléaires ont également été réalisés à partir de cellules non différenciées, en prolifération (Pro).

A. : Western blot réalisé à partir de 20  $\mu$ g de protéines nucléaires. L'expression de Myf 6 est détectée grâce à l'anticorps anti-Myf 6 (Santa-Cruz, SC-784) et celle de l'histone H1 (contrôle de charge) grâce à l'anticorps anti-Histone H1 (Santa-Cruz, SC-8030).

B. : Quantification du western blot présenté en A. L'intégration de la densité optique (IOD) des différentes bandes a été mesurée par le logiciel Totallab (Amersham Pharmacia Biotech). Les résultats sont exprimés sous forme d'un rapport entre les IOD correspondant à Myo D et les IOD des bandes de H1.

C. : Activité de liaison de Myf 6 à l'ADN, évaluée par dosage colorimétrique Trans AM. Chaque point représente la moyenne  $\pm$  l'écart-type de 3 mesures réalisées à partir des mêmes extraits nucléaires que ceux utilisés en A.



Afin de tester cette hypothèse, nous avons voulu répéter l'expérience mais ceci n'a pas été possible pour cause de contamination.

#### **4. Effet de la créatine sur l'expression et l'activité de liaison à l'ADN de MEF- 2A (Myocyte Enhancer Factor-2A)**

Comme leur nom l'indique, les MEFs sont des facteurs de transcription musculaires qui permettent d'augmenter l'effet des MRFs et donc la différenciation myogénique, en se liant à ceux-ci ou au niveau d'une région MEF-box, riche en A et en T. (voir point 2.2.2. de l'Introduction)

Dans le cadre de ce mémoire, nous avons également étudié l'effet que pouvait avoir une supplémentation en créatine sur l'expression et l'activité de liaison à l'ADN de MEF-2A, le membre le plus étudié de la famille des MEFs. En effet, une augmentation de la taille des myotubes en culture, comme celle montrée au point 1. des Résultats et Discussion, pourrait également s'expliquer par une élévation du taux d'expression de ces facteurs.

Afin de tester cette hypothèse, nous avons réalisé un western blot et un dosage colorimétrique Trans AM, avec les mêmes extraits que ceux utilisés dans les expériences menées pour l'étude des MRFs (voir point 3 des Résultats et Discussion).

Le western blot présenté à la **figure II. 10. A.** nous montre que l'expression de MEF-2A augmente jusqu'au Jour 3 et diminue rapidement par la suite.

Les résultats de la quantification de ce western blot présentés à la **figure II. 10. B.** montrent un effet positif de la créatine au Jour 2 de la différenciation myogénique. Par contre, au Jour 3, nous observons une forte diminution de l'expression de MEF-2A. Tout comme dans le cas de Myo D (voir point 3.2 des Résultats et Discussion), cette diminution pourrait être due à une erreur de manipulation ou à un artéfact. Il faudrait donc répéter l'expérience afin de pouvoir tirer une conclusion mais ceci n'a pas été possible par manque de temps.

Contrairement aux dosages colorimétriques réalisés afin de détecter l'activité de liaison à l'ADN des différents MRFs, c'est la séquence consensus de la MEF-box et non de la E-box qui est fixée dans la plaque multi-puits. La **figure II. 10. C.** nous montre que l'activité de liaison de MEF-2A augmente jusqu'au Jour 2 et diminue ensuite, mais ne permet pas de mettre en évidence un effet positif de la créatine sur celle-ci.

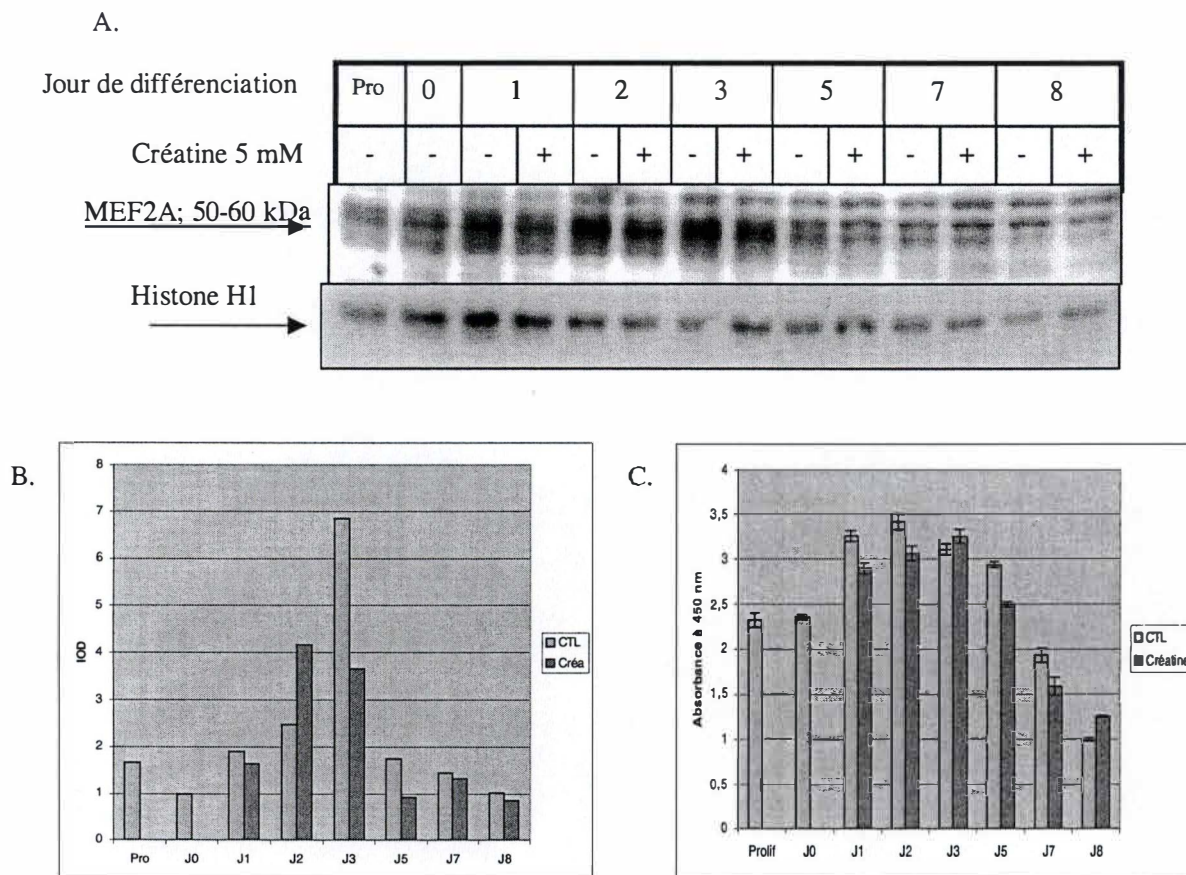


Figure II. 10. : Effet de la créatine sur l'expression (A. et B.) et sur l'activité de liaison à l'ADN (C.) de MEF 2A au cours du processus de la différenciation myogénique.

Les cellules  $C_2C_{12}$  à confluence ont été différenciées en absence (CTL) ou en présence de 5 mM de créatine. Des extraits protéiques nucléaires ont été réalisés après 0 (J0), 1, 2, 3, 5, 7 et 8 jours de traitement, avec un renouvellement du milieu de culture tous les 2 jours. Comme contrôle, des extraits protéiques nucléaires ont également été réalisés à partir de cellules non différenciées, en prolifération (Pro).

A. : Western blot réalisé à partir de 20  $\mu$ g de protéines nucléaires. L'expression de MEF 2A est détectée grâce à l'anticorps anti-MEF 2A (Santa-Cruz, SC-10794) et celle de l'histone H1 (contrôle de charge) grâce à l'anticorps anti-Histone H1 (Santa-Cruz, SC-8030).

B. : Quantification du western blot présenté en A. L'intégration de la densité optique (IOD) des différentes bandes a été mesurée par le logiciel Totallab (Amersham Pharmacia Biotech). Les résultats sont exprimés sous forme d'un rapport entre les IOD correspondant à Myo D et les IOD des bandes de H1.

C. : Activité de liaison de MEF 2A à l'ADN au niveau de la séquence consensus de la MEF-box, évaluée par dosage colorimétrique Trans AM. Chaque point représente la moyenne  $\pm$  l'écart-type de 3 mesures réalisées à partir des mêmes extraits nucléaires que ceux utilisés en A.

## **5. Effet de la créatine sur la voie de la PI-3K (Phosphoinositol-3 kinase)**

Comme nous l'avons vu au point 3.2. de l'Introduction, la voie de la PI3K (ou Phosphoinositol 3 Kinase) est impliquée dans le processus de la différenciation myogénique lorsque, comme dans le cadre de ce mémoire, celle-ci est induite par un appauvrissement du milieu de culture en sérum (Jiang et al., 1999).

C'est pour cette raison mais aussi pour son effet possible sur la synthèse protéique et donc aussi sur l'augmentation de la masse musculaire que nous nous sommes intéressés à cette voie de transduction.

Pour des raisons indépendantes de notre volonté expliquées dans le point traitant des conclusions et des perspectives de ce mémoire, nous ne sommes pas en mesure de présenter les résultats en rapport avec la PI3K.

## *Conclusion et perspectives*

## Conclusions et Perspectives

Tout au long de ce mémoire, nous avons étudié l'effet d'une supplémentation en créatine sur un modèle de différenciation de myoblastes murins C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> en culture.

Grâce aux différentes techniques décrites dans la section Matériels & Méthodes, nous avons mis en évidence un effet de la créatine à différents niveaux.

Tout d'abord, la créatine exerce un effet positif sur la taille des myotubes obtenus en culture, en condition de différenciation. La différence de largeur des myotubes mesurée entre les 2 conditions de culture, contrôle et 5 mM de créatine, s'est révélée être significative, d'après un test t de Student. Ensuite, après avoir réalisé des extractions protéiques totales, ainsi que des dosages de ces protéines, nous avons remarqué une augmentation hautement significative de la quantité de protéines totales. Des auteurs tels que Vandenberghe ou Persky ont également observé une augmentation du diamètre des fibres musculaires, chez des sportifs absorbant de la créatine comme supplément alimentaire. Parallèlement, ils ont observé une augmentation de la masse musculaire chez les individus supplémentés avec la créatine (Vandenberghe et al., 1997); (Persky and Brazeau, 2001). Dans notre modèle cellulaire de différenciation, nous avons également mis en évidence une augmentation de la quantité de protéines dans les cellules différenciées en présence de créatine.

Des études réalisées sur des cultures ont effectivement montré une augmentation, de la synthèse protéique en présence de créatine, alors que le taux de dégradation des protéines reste inchangé (Ingwall et al., 1974). Toutefois, ces résultats sont controversés, d'autant que d'autres études menées *in vivo* ont mis en évidence une diminution du catabolisme protéique sans modification de la synthèse protéique (pour une revue (Persky and Brazeau, 2001). Afin de déterminer si la créatine stimule l'anabolisme ou inhibe le catabolisme des protéines dans notre modèle cellulaire, nous avons réalisé une expérience d'incorporation de leucine tritiée dans des cellules différenciées dans du milieu de culture contenant ou non 5 mM de créatine. Nous avons ainsi mis en évidence une augmentation significative de la synthèse protéique en présence de créatine dans les cellules en différenciation. Nos résultats ont donc confirmé que l'augmentation de la quantité de protéines totales observée avant n'est pas due à une diminution du catabolisme protéique mais bien à une stimulation de l'anabolisme.

Pour expliquer cette augmentation de taille des myotubes, on peut aussi se tourner vers les MRFs. En effet, Psilander et collaborateurs ont décrit une hypertrophie musculaire chez des sujets mâles ayant suivi un entraînement physique, sans supplémentation en créatine, et ils ont montré que celle-ci était mise en relation avec une augmentation du niveau d'ARNm codant pour la myogénine, Myo D et Myf 6, trois des quatre membres de la famille des MRFs, au niveau des muscles squelettiques. Ils émettent l'hypothèse que l'hypertrophie musculaire observée est dépendante de l'expression de ces MRFs (Psilander et al., 2003). Afin de voir si une supplémentation en créatine pouvait aussi avoir en effet sur l'expression et/ou sur l'activité de liaison à l'ADN des MRFs, nous avons réalisé d'une part des western blot et d'autre part des

dosages colorimétriques à partir d'extraits protéiques nucléaires obtenus pour des cellules C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> en prolifération et à différents jours de la différenciation myogénique.

- Aucun effet positif de la créatine n'a pu être détecté pour Myf 5 et la myogénine, et ce, tant au niveau de l'expression qu'au niveau de l'activité de liaison à l'ADN. Notons tout de même que le profil d'expression obtenu correspond à ce qui était attendu sur base des données de la littérature.
- En ce qui concerne Myo D, en présence de créatine, nous avons observé une augmentation de son expression au Jour 2 de la différenciation myogénique. Cette augmentation d'expression s'est traduite par une augmentation de l'activité de liaison à l'ADN de Myo D. Ceci pourrait peut-être être mis en relation avec une augmentation de la taille des myotubes observées à ce moment de la différenciation.
- Enfin, pour Myf 6 qui est impliqué à la fin du programme de différenciation, l'apport en créatine exerce un effet positif sur l'activité de liaison à l'ADN, pour les jours 5 et 8 de notre cinétique de différenciation. Malheureusement, aucune conclusion quant à l'effet de la créatine sur l'expression de Myf 6 ne peut être tirée suite à une qualité médiocre du western blot. Malgré cela, le changement de niveau dans l'activité de liaison à l'ADN de Myf 6 confirme ce qui avait été mis en évidence par Hespel et collaborateurs. En effet, ces auteurs ont testé l'effet de la créatine sur la réhabilitation survenue après avoir plâtré un membre, ceci ayant conduit à une atrophie musculaire. L'absorption de créatine permet d'accélérer la réhabilitation. Lors d'une réhabilitation sans créatine mais avec des exercices physiques, on peut observer une augmentation de l'expression de la myogénine tandis que lorsque que les sujets reçoivent de la créatine pendant leur réhabilitation, c'est une augmentation de l'expression de Myf 6 qui est observée (Hespel et al., 2001). Ces résultats permettent d'imaginer que Myf 6 est directement impliqué dans l'hypertrophie des fibres musculaires dans le cas d'une supplémentation en créatine.

On peut alors se demander par quelle voie intracellulaire ces effets de la créatine sont médiés. Un candidat intéressant nous paraît être la voie de la PI3K. En effet, comme décrit au point 3.2. de l'Introduction, la voie de la PI3K est indispensable à la différenciation myogénique. De plus, une fois que la PI3K est activée, par exemple par l'IGF-1, elle active à son tour plusieurs effecteurs, dont la p70<sup>S6K</sup>, qui agit au niveau de la traduction des protéines. Nous pouvons donc envisager que via cet effet indirect sur la synthèse protéique, la PI3K joue un rôle sur l'hypertrophie des myotubes observée en présence de créatine. La créatine, en stimulant la production d'IGF-1, pourrait stimuler l'activation de la PI3K, ce qui se répercuterait sur l'activation de p70<sup>S6K</sup>, qui à son tour stimulerait la synthèse protéique et expliquerait donc l'hypertrophie des myotubes. Afin de tester cette hypothèse, nous avons lancé un programme de différenciation de cellules C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> en présence ou en absence de créatine et de wortmanine, ou de LY294002, deux inhibiteurs connus de la voie de la PI3K. Le LY294002 à une concentration de 50 µM s'est avéré être toxique pour les cellules. Aucun résultat n'a donc pu être obtenu pour cette partie de l'expérience. La wortmanine quant à elle, beaucoup mieux tolérée par les cellules, a, comme attendu, largement inhibé la formation de myotubes, que ce soit en présence ou non de créatine. Malheureusement, divers problèmes de contamination cellulaire et d'anticorps, entre autres, nous ont empêché de mener à bien ces expériences et d'en tirer les conclusions

quant à l'implication de la voie de la PI3K, en présence de créatine, au niveau de la synthèse protéique, du diamètre des myotubes, de l'expression et de l'activité de liaison à l'ADN des différents MRFs, mais plus particulièrement de Myo D et Myf 6.

Remarquons tout de même que dans le cadre de ce mémoire, nous n'avons travaillé que sur un modèle cellulaire, possédant ses limites mais qui peut permettre de comprendre ce qui peut se passer *in vivo* et donc de préparer de véritables études *in vivo*.

Un premier point au niveau des perspectives serait de confirmer nos résultats relatifs à l'expression et l'activité de liaison à l'ADN de Myo D et Myf 6. Les expériences commencées avec les inhibiteurs de la PI3K devraient être menées à bien. Ensuite, il serait intéressant de réaliser une incorporation de leucine tritiée en présence ou en absence de créatine et/ou de wortmanine afin de découvrir quel est réellement l'effet d'une inhibition de la voie de la PI3K sur la synthèse protéique au cours de la différenciation myogénique. Enfin, l'utilisation d'autres inhibiteurs intervenant dans la voie de la PI3K, tels que la rapamicyne, pourraient être testés afin de cibler les effecteurs de la PI3K impliqués dans le processus de l'hypertrophie des myotubes observé en présence de créatine.

## *Matériels et méthodes*



# 1. Culture cellulaire

## 1.1. Culture cellulaire

### ➤ Matériel

#### - Cellules :

Les cellules C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> sont des myoblastes murins disponibles à l'A.T.C.C. (American Type Culture Collection, # CRL-1772). Ce sont des cellules adhérentes de morphologie fibroblastique.

#### - Solutions :

- **Milieu de rinçage** : Solution stérile de PBS (Phosphate Buffer Saline) : 0,9 % NaCl, 10 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7,4
- **Trypsine-EDTA** : Solution stérile de trypsine à 0,05 %; EDTA (Ethylène Diamine Tétra Acétique) 0,53 mM (**Gibco BRL**, Paisley, Grande-Bretagne)
- **DHG** : Dulbecco's modified eagle's medium + High Glucose (4,5 g/l) (**Gibco BRL**, #41966-029, Paisley, Grande-Bretagne) dans lequel on ajoute 4 mM de L-glutamine (**Sigma**, Saint-Louis, USA).
- **DHG + 10 % FCS** : Milieu DHG enrichi de 10 % de sérum de veau foetal (**Gibco BRL**, #10270-106, Paisley, Grande-Bretagne)
- **DHG + 1 % HS** : Milieu DHG enrichi de 1 % de sérum de cheval (**Gibco BRL**, #16050-080, Paisley, Grande-Bretagne)
- **DMSO** (Diméthylsulfoxyde) (**Acros Chimica**, Belgique)

### ➤ Méthode de culture et de différenciation

Les cellules C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> sont connues pour conserver leur potentiel myoblastique tant que celles-ci sont maintenues en prolifération. En effet, ces myoblastes ont tendance à se différencier en myocytes de manière irréversible lorsqu'ils atteignent la confluence. Nous distinguons donc deux cas de figure dans la culture de ces cellules :

- le maintien de la lignée cellulaire : les cellules sont passées 3 fois par semaine (en 10 par exemple) de manière à ne jamais excéder les 80 % de densité cellulaire. Ici, les cellules C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> sont maintenues dans du milieu DHG 10 % + FCS dans des boîtes de 75 cm<sup>2</sup> (T75, **Corning**, New-York, USA).
- l'engagement vers la différenciation : les cellules sontensemencées à raison de 27000 cellules /cm<sup>2</sup> dans du milieu DHG + 10 % FCS. Le lendemain, alors que le tapis cellulaire a atteint environ 90 % de confluence, le milieu de culture est remplacé par du DHG + 1 % HS, faisant donc office de milieu de différenciation. Celui-ci sera renouvelé tous les 2 jours. La mise

en place du milieu DHG + 1 % correspond à ce que nous appelons J0 dans nos résultats. Les molécules dont on veut tester l'effet sur la différenciation myocytaire sont également ajoutées à ce moment (5 mM Créatine (**Sigma**, #C0780, Saint-Louis, USA), 10  $\mu$ M Wortaninne (**Biomol**, # P-5259 C), LY294002 (**Calbiochem**, #154447-36-6, USA)).

L'état de confluence conjugué à une faible concentration en sérum déclenche la différenciation myogénique.

Lors des repiquages, toutes les solutions sont préchauffées à 37°C. Les cellules sont tout d'abord rincées dans 10 ml de PBS, puis incubées  $\pm$  1 minute dans 2 ml de trypsine-EDTA. Lorsque les cellules apparaissent réfringentes au microscope, l'excédant de trypsine-EDTA est retiré et la boîte est placée pendant  $\pm$  5 minutes à 37°C afin de permettre le détachement complet du tapis cellulaire. L'action de la trypsine est alors stoppée par l'ajout de DHG + 10 % FCS. La suspension cellulaire ainsi obtenue est homogénéisée et répartie dans de nouvelles boîtes qui seront replacées à 37°C, dans une étuve contenant 5 % de CO<sub>2</sub> (**Heraeus**, Allemagne).

## **1.2. Congélation de cellules**

Quand les cellules C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> en culture sont encore à faible densité, elles sont rincées avec du PBS stérile et détachées de leur support avec de la trypsine-EDTA. Elles sont alors récoltées dans du DHG + 10 % FCS et centrifugées pendant 10 minutes à 1000 rpm. Le culot ainsi obtenu est resuspendu dans du milieu contenant 20 % de sérum de veau foetal et 5 % de DMSO. Cette suspension cellulaire est alors transférée dans un cryotube placé pendant une nuit à -70°C, puis conservée dans une cuve d'azote liquide.

## **1.3. Décongélation de cellules**

Dès son retrait de l'azote liquide, le cryotube doit être plongé dans un bain à 37°C afin que la décongélation soit la plus rapide possible. Les cellules sont alors centrifugées pendant 5 minutes à 1000 rpm. Le culot de cellules formé est resuspendu dans 15 ml de DHG + 10 % FCS et transféré dans une boîte T 75. Quelques heures plus tard, le milieu de culture sera changé afin d'éliminer au maximum toutes traces de DMSO pouvant être toxique pour les cellules.

## **2. Extractions protéiques**

### **➤ Matériel**

- **PBS + 1 mM Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>, 5 mM NaF** : Phosphate Buffer Saline (10 mM tampon phosphate KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7,4, 0,9 % NaCl) fraîchement additionné de 1 mM Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> et 5 mM NaF
- **HB 1x** (Hypotonic Buffer) : 5 mM NaF (**Merck**, Darmstadt, Allemagne), 1mM Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> (**Sigma**, Saint-Louis, USA), 20 mM

HEPES pH 7.9 (**Acros Organics**, Belgique), 0,1 mM EDTA (Titriplex, **Merck**, Darmstadt, Allemagne).

- **Tampon de lyse** : HB 1x + 0,5 % NP-40 (Nonidet P-40, **Sigma**, Saint-Louis, USA).
- **Re** (Resuspension Buffer) : HB 1x + Glycérol 17,4 % (**Merck**, Darmstadt, Allemagne). Des inhibiteurs de protéases (PIC) et de phosphatases (PIB) sont fraîchement ajoutés avant l'extraction.
- **Sa** (Saline Buffer) : HB 1x, Glycérol 17,4 % (**Merck**, Darmstadt, Allemagne), 0,4 M NaCl (**Merck**, Darmstadt, Allemagne). Des inhibiteurs de protéases (PIC) et de phosphatases (PIB) sont fraîchement ajoutés avant l'extraction.
- **PIC** (Protease Inhibitor Cocktail) : 1 tablette de PIC (**Roche**, #1697498, Mannheim, Allemagne) pour 2 ml d'H<sub>2</sub>O. Cette solution stock 25x concentrée est fractionnée et conservée à -20°C.
- **PIB** (Phosphatase Inhibitor Buffer) : 25 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> (**Sigma**, Saint-Louis, USA); 250 mM PNPP (p-Nitrophenyl Phosphate; **Sigma**, Saint-Louis, USA); 250 mM β-glycérol phosphate (**Sigma**, Saint-Louis, USA) et 125 mM NaF (**Merck**, Darmstadt, Allemagne). Cette solution stock 25x est fractionnée et conservée à -20°C.
- **MPER** (Mammalian Protein Extraction Reagent) (**Pierce**, #78501, Rockford, USA)
- **Colorant Bradford**: Bio-Rad Protein Assay (**Biorad**, Munich, Allemagne)
- **Etalon BSA** (Bovine Serum Albumin) : 2μg/μl (**Pierce**, #23210, Rockford, USA))

### ➤ Méthode d'extraction

Toute l'extraction est réalisée à 4°C avec des solutions glacées. Les cellules sont d'abord rincées dans 5 ml de PBS 1 mM Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>, 5 mM NaF, puis incubées pendant 5 minutes dans 5 ml de HB 1x avant d'être raclées dans 500 μl de tampon de lyse. La suspension cellulaire est gardée 5 minutes sur glace avant d'être centrifugée 1 minute à 13000 rpm.

Le surnageant correspondant aux **extraits cytoplasmiques** est éventuellement récolté tandis que le culot de noyaux est resuspendu dans 30 μl de Re pour des cellules en pleine prolifération ou 100 μl pour des cellules confluentes ou en différenciation. Le volume présent à ce moment dans le microtube est alors doublé par l'ajout d'un volume égal de Sa. Les microtubes sont ensuite agités sur une roue pendant un minimum de 30 minutes en chambre froide, puis ils sont centrifugés 10 minutes, à 13000 rpm à 4°C. Le surnageant correspondant aux **extraits nucléaires** est alors fractionné et congelé en vue de réaliser ultérieurement des western blot ou des tests colorimétriques de liaison à l'ADN (Trans AM), après avoir déterminé la concentration en protéines dans les différents échantillons via la méthode de Bradford.

Au lieu de séparer les protéines cytoplasmiques des protéines nucléaires, il est également possible de réaliser une **extraction protéique totale** par lyse au MPER. Après 2 rinçages avec du PBS, le tapis cellulaire est incubé en présence de MPER additionné de PIC et de PIB à température ambiante, pendant 15 minutes sous agitation légère. Les lysats obtenus sont ensuite centrifugés pendant 10 minutes à 13000 rpm

avant de récolter les surnageants en vue d'estimer leur concentration en protéines (par la méthode de Bradford).

### **3. Western blotting**

#### **3.1. Principe**

Après avoir réalisé les extractions protéiques comme décrit au point 2, on réalise une séparation des protéines par électrophorèse sur gel de polyacrylamide contenant du SDS (SDS-PAGE). La séparation de ces protéines se fait alors en fonction de leur poids moléculaire, grâce à une différence de potentiel appliquée de part et d'autre du gel. En plus de tous les échantillons, on fait migrer un étalon de poids moléculaire coloré. En fin de migration, les protéines sont transférées sur une membrane en PVDF (Polyvinylidène fluoride). Ensuite, on révèle la présence de la ou des protéine(s) d'intérêt en utilisant la spécificité de reconnaissance d'un anticorps primaire à son tour reconnu par un anticorps secondaire couplé à une peroxydase, la HRP (Horse Radish Peroxydase).

La révélation se fera enfin via incubation de la membrane PVDF avec un mélange équivolume composé du substrat de la peroxydase, l' $H_2O_2$ , et de luminol, provoquant l'émission de photons capables d'impressionner les films autoradiographiques.

#### **3.2 Préparation des échantillons**

##### ➤ Matériel

- **Lysats cellulaires** provenant des différentes conditions de culture
- **Mélange équivolume de Re/Sa**
- **Bleu de charge 5x** de composition: 0.5 M Tris pH 6,8; 20 % SDS; 20 % Glycérol; 1 % Bleu de bromophénol; 20 % de  $\beta$ -mercaptoéthanol
- **Etalon de poids moléculaire:** (Rainbow, Amersham, #RPN 800, Buckinghamshire, Grande-Bretagne)

##### ➤ Méthode

Le volume de lysat cellulaire correspondant à 20  $\mu$ g de protéines est prélevé pour chaque condition et porté à 30  $\mu$ l en y ajoutant 6  $\mu$ l de bleu de charge (pour que celui-ci soit 1x concentré) et le volume manquant de Re/Sa. Tous les échantillons ainsi préparés sont alors bouillis pendant 3 minutes et ensuite centrifugés pendant un court moment à 13000 rpm avant d'être chargés. Un puits est réservé pour 12  $\mu$ l d'étalon de poids moléculaire.

## **Running gel**

**Gel buffer** : Tris 1,5 M + SDS 14 mM; pH 8,9

<b>GEL MIX</b>	<b>15 %</b>	<b>12%</b>	<b>10%</b>	<b>8%</b>	<b>6%</b>
Gel buffer	60 ml	60 ml	60 ml	60 ml	60 ml
Acryl/Bis(30/0,8)	125 ml	100 ml	83 ml	65 ml	50 ml
H <sub>2</sub> O	65 ml	90 ml	107 ml	125 ml	140 ml

Table III. 1. : Protocole de préparation des runnings gels

## **Stacking gel**

**Spacer gel buffer** : Tris 420 mM + SDS 14 mM ; pH 6,8

<b>Spacer gel mix</b>	
Spacer gel buffer	30 ml
Acryl/Bis(30/0,8)	20 ml
H <sub>2</sub> O	70 ml

Table III. 2. : Protocole de préparation des stackings gels

### 3.3 Préparation des gels et migration

#### 3.3.1 Préparation des gels

##### ➤ Matériel

- Gel mix du pourcentage choisi pour le running gel (Table III.1.)
- Spacer gel mix pour le stacking gel (Table III.2.)
- APS 10 % (Ammonium persulphate) (Amersham, #17-1311-01, Buckinghamshire, Grande-Bretagne)
- TEMED (Amersham, #17-1312-01, Buckinghamshire, Grande-Bretagne)
- Running Buffer 10x ou Tampon de migration 10x contenant 500 mM Tris (ICN Biomedicals, #819623, Ohio, USA), 530 mM Glycine (ICN Biomedicals, #808822, Ohio, USA), 35 mM SDS (ICN Biomedicals, #811030, Ohio, USA)

##### ➤ Méthode

Le running gel ou gel de séparation est préparé en mélangeant 35 ml de "Gel Mix", 175 µl d'APS et 10,5 µl de TEMED. Dès que les agents polymérisant (APS et TEMED) sont ajoutés, le mélange est versé entre 2 plaques et recouvert d'isobutanol ou isopropanol. Après 45 minutes de polymérisation, l'alcool est retiré et le dessus du gel est abondamment rincé à l'eau distillée. Toute trace d'eau sera ensuite éliminée à l'aide de papier Whatman avant de couler le gel concentrateur ou stacking gel. Celui-ci est constitué de 10 ml de "Spacer Gel Mix", 50 µl d'APS et 3 µl de TEMED. Un peigne est placé entre les 2 plaques de verre avant polymérisation afin de former les puits du gel.

#### 3.3.2. Migration

Le tampon de migration 1x est versé dans les réservoirs de la cathode et de l'anode et les échantillons sont déposés dans les puits.

La migration s'effectue à 35 mA dans le gel de concentration ( $\pm$  30 minutes) et à 45 mA dans le gel de séparation ( $\pm$  4 heures).

### 3.4. Transfert ou blotting

##### ➤ Matériel

- Membrane de PVDF (Polyvinylidène fluoride, Hybond-P, Amersham, Buckinghamshire, Grande-Bretagne)
- Blotting buffer ou Tampon de transfert contenant 40 mM Tris, 300 mM Glycine, 20 % méthanol

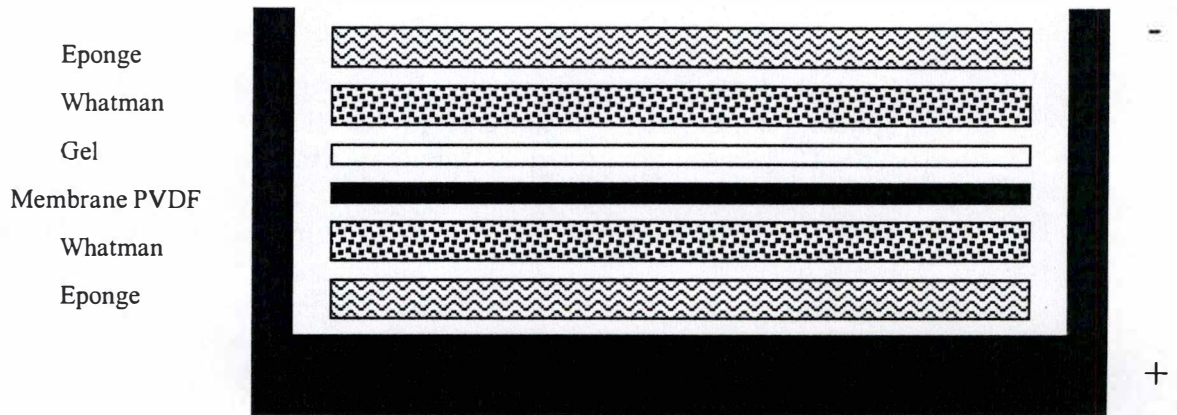


Figure III.1. : Représentation du montage en "sandwich" utilisé pour le transfert semi-sec des protéines d'un gel SDS-PAGE sur une membrane de PVDF lors d'un western blot

- **Papier Whatman (Macherey-Nagel, Allemagne)**
- **Cuve de transfert semi sec (Pharmacia Biotech Inc., San Francisco, USA)**

### ➤ Méthode

Une fois la migration terminée, le gel est déposé sur une membrane en PVDF préalablement réhydratée pendant 1 minute dans du méthanol et ensuite 5 minutes dans du tampon de transfert. De part et d'autre de ces deux couches, on place encore une épaisseur de papier Whatman ainsi qu'une d'éponge eux aussi imbibés de tampon de transfert. Ce "sandwich" est alors déposé dans une cuve de transfert, la membrane étant orientée vers l'anode. (Figure III. 1.) Le transfert se déroule durant toute la nuit, à 35 mA.

## 3.5. Révélation de la membrane avec des anticorps

### ➤ Matériel

- **Tampon TBS 10x (Tris Buffer Saline) : 200 mM Tris; 140 mM NaCl; pH 7,6**
- **Tampon TBS-T : TBS 1x auquel on ajoute 0,1 % de Tween 20 (Sigma, Saint-Louis, USA)**
- **Gloria (Nestle, Belgique)**
- **Anticorps anti-MyoD : anticorps polyclonal de lapin (SC-304, Santa Cruz, USA)**
- **Anticorps anti Myf6 : anticorps polyclonal de lapin (SC-784, Santa Cruz, USA)**
- **Anticorps anti- Myf5 : anticorps polyclonal de lapin (SC-302, Santa-Cruz, USA)**
- **Anticorps anti-Myogénine : anticorps monoclonal de souris (556358, Pharmingen, USA)**
- **Anticorps anti-MEF2 : anticorps polyclonal de lapin (H-300, SC-10794, Santa-Cruz, USA)**
- **Anticorps anti-Histone H-1 : anticorps monoclonal de souris (SC-8030, Santa-Cruz, USA)**
- **Anticorps anti-TBP (TATA Binding Protein) : anticorps polyclonal de lapin (SC-204, Santa-Cruz, USA)**
- **Anticorps secondaire anti-Ig de lapin conjugué à la HRP (NA934V, Amersham, Buckinghamshire, Grande-Bretagne)**
- **Anticorps secondaire anti-Ig de souris conjugué à la HRP (NA931V, Amersham, Buckinghamshire, Grande-Bretagne)**
- **Solution ECL (Enhanced Chemoluminescent) (Western Lightning, Perkin Elmer, USA) contenant 50 % d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et 50 % de luminol**
- **Films autoradiographiques : Hyperfilms ECL (Amersham, Buckinghamshire, Grande-Bretagne)**
- **Révéléateur (Ilford 2000 RT, Ilford, Grande-Bretagne)**
- **Fixateur (Ilford 2000 RT, Ilford, Grande-Bretagne)**



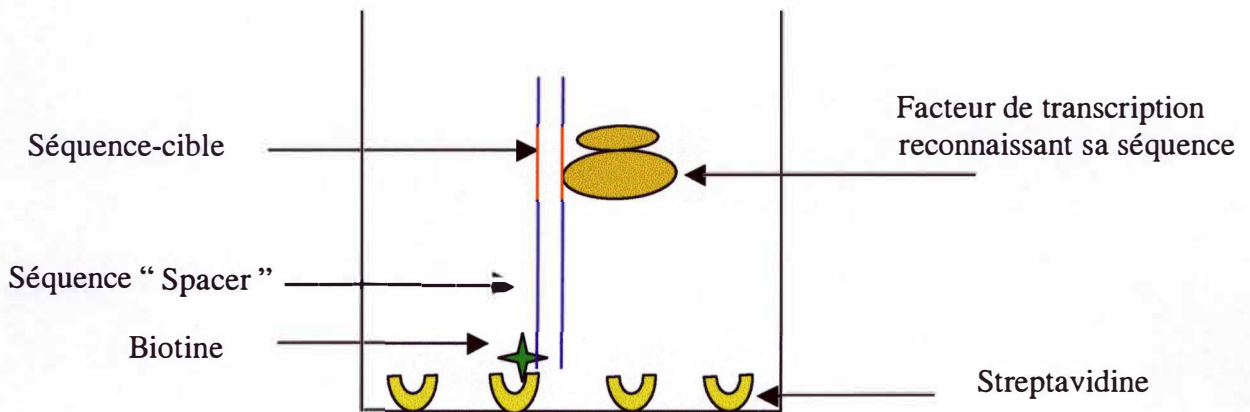


Figure III. 2. : Représentation d'un oligonucléotide biotinylé fixé dans un puits coaté à la streptavidine

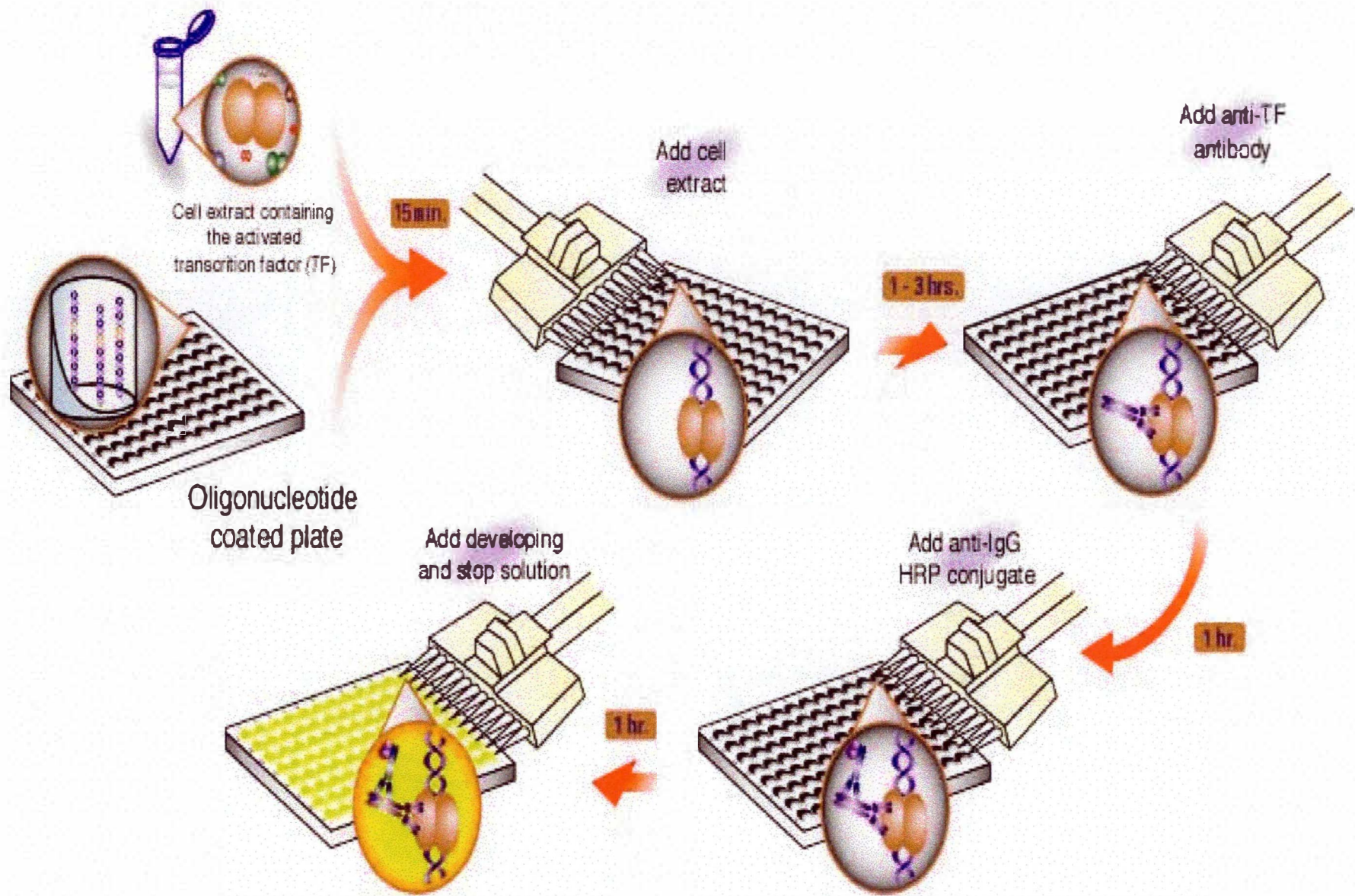


Figure III. 3. : Principe du dosage d'activité de liaison à l'ADN d'un facteur de transcription ("Trans AM")

## ➤ Méthode

Quand le transfert est terminé, la membrane est bloquée pendant 1 heure dans du TBS-T + 5 % Gloria afin de saturer les sites de liaison aspécifiques que les anticorps primaires utilisés pourraient reconnaître.

Ensuite, les anticorps primaires sont dilués 1000x dans du TBS-T + 5 % Gloria et mis en présence de la membrane pendant environ 2 heures, sous agitation et à température ambiante, après quoi la membrane sera rincée 3x dans du TBS-T + 5 % Gloria. Selon l'anticorps primaire qui aura été utilisé, la détection se fera par incubation de la membrane avec un anticorps secondaire anti-Ig de lapin ou de souris couplés à une peroxydase (HRP) dilué 2000x dans du TBS-T + 5 % Gloria, pendant 45 minutes, à température ambiante et sous agitation. Après, la membrane sera encore rincée 2x dans du TBS-T 5 % Gloria et 2x dans du TBS-T.

Enfin, la membrane est incubée dans une solution ECL pendant 1,5 minute avant de passer en chambre noire où on exposera des films autoradiographiques pendant des temps variables, afin d'obtenir l'exposition optimale. Le film passera alors successivement dans un bain de révélation, un bain d'eau, un bain de fixateur, et enfin un dernier rinçage à l'eau avant de faire sécher le film à l'air libre.

## **4. Dosage de l'activité de liaison à l'ADN d'un facteur de transcription en plaques multipuits**

### **4.1. Principe**

Un oligonucléotide double brin de 127 pb contenant un seul site de liaison pour le facteur de transcription est fixé dans une plaque 96 puits coatée à la streptavidine. La séquence cible du facteur de transcription se trouve à l'autre extrémité de l'oligonucléotide, ce qui le rend facilement accessible pour les facteurs de transcription (Figure III.2.). Ces oligonucléotides sont conçus, produits par PCR (Polymerase Chain Reaction), purifiés et mis à disposition par l'équipe Facteurs de Transcription de EAT (**Eppendorf Advanced Technology**, Namur, Belgique). Nous ne décrivons donc pas ces étapes dans ce mémoire.

Les puits contenant le trappeur sont incubés en présence d'extraits protéiques nucléaires. La liaison éventuelle du facteur de transcription sur sa séquence-cible est ensuite mise en évidence par des incubations successives avec des anticorps primaires spécifiquement dirigés contre le facteur de transcription et des anticorps secondaires conjugués à la peroxydase (HRP). La révélation s'effectue finalement grâce à une réaction colorimétrique (Figure III.3.).

## 4.2. Fixation du trappeur double brin dans la plaque multipuits

### ➤ Matériel

- **Plaque 96 puits** coatée à la streptavidine (Roche, Mannheim, Allemagne)
- **PBS** : 1 mM tampon phosphate pH 7,4, 0,9 % NaCl
- **PBS 50** : tampon phosphate 10 mM; pH 7,4; 0,3 % NaCl
- **Tween 20** (Sigma, Saint-Louis, USA)
- **Trappeurs biotinylés** contenant la séquence consensus du facteur de transcription d'intérêt

### ➤ Méthode

On dépose 50 µl d'une solution de trappeur biotinylé dilué dans du PBS, à une concentration finale de 4 pmoles/puits. La plaque est incubée 1 heure à 37°C avec le trappeur puis lavée 2x avec 100 µl de PBS 50-Tween 20 0,1 % et 1x avec 200 µl d'H<sub>2</sub>O. La plaque est finalement séchée pendant environ 45 minutes en chambre chaude (37°C) avant d'être conservée en chambre froide jusqu'au dosage proprement dit.

## 4.3. Détection de l'activité de liaison à l'ADN d'un facteur de transcription en plaque 96 puits

### ➤ Matériel

- **Tampon de lyse** : 500 µl Re, 500 µl Sa, 40 µl PIC, 40 µl PIB (cfr point 2.), 1 µl DTT 1M (Dithiothréitol, Sigma, Saint-Louis, USA)
- **Tampon de liaison** : composé de :
  - 20 mM HEPES (Acros Organic, New Jersey, USA)
  - 100 mM KCl (Merck, Darmstadt, Allemagne)
  - 10 mM MgCl<sub>2</sub> (Merck, Darmstadt, Allemagne)
  - 2 mM EDTA (Merck, Darmstadt, Allemagne)
  - Glycérol 10 % (Merck, Darmstadt, Allemagne)
- **Strips de plaques** coatées avec le trappeur d'intérêt (cfr point 4.2.)
- **PBS** : 10 mM tampon phosphate, pH 7,4, 0,9 % NaCl
- **PBS 50** : tampon phosphate 10 mM; pH 7.4; NaCl 0,3 %
- **Tween 20** (Sigma, Saint-Louis, USA)
- **Gloria** (Nestle, Belgique)
- **BSA** (Bovine Serum Albumin, Sigma, #100K1355, Saint-Louis, USA)
- **Anticorps anti-MyoD** : anticorps polyclonal de lapin (SC-760, Santa-Cruz, USA)
- **Anticorps anti-Myogénine** : anticorps monoclonal de souris (556358, Pharmingen, USA)
- **Anticorps anti-Myf6** : anticorps polyclonal de lapin (SC-310, Santa-Cruz, USA)

- **Anticorps anti-Myf5** : anticorps polyclonal de lapin (SC-302, **Santa-Cruz, USA**)
- **Anticorps anti-MEF2** : anticorps polyclonal de lapin (SC-10794, **Santa-Cruz, USA**)
- **Anticorps secondaire anti-Ig de lapin conjugué à la HRP** (SC-2054, **Santa-Cruz, USA**)
- **Anticorps secondaire anti-Ig de souris conjugué à la HRP** (SC-2055, **Santa-Cruz, USA**)
- **TMB** : Tétraméthyl Benzidine (**Biosource Europe, Belgique**)
- **Solution Stop** : H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (**Biosource Europe, Belgique**)
- **Lecteur de plaques multipuits** (Ultramark, Microplate Imaging System, **Biorad, Munich, Allemagne**)

### ➤ Méthode

Tout le dosage s'effectue à température ambiante. On dépose dans chaque puits 40 µl de tampon de liaison puis 5 µg d'extraits nucléaires dilués dans 10 µl de tampon de lyse. Les blancs correspondent à 10 µl de tampon de lyse + 40 µl de tampon de liaison. Après une incubation d'une heure sous agitation, 3 lavages avec 200 µl de PBS 50 + Tween 20 0,1 % sont effectués.

Les anticorps primaires dirigés contre le facteur de transcription d'intérêt sont alors dilués 500x dans du PBS 50 + BSA 1 % et incubés pendant 1 heure. 3 lavages avec 200 µl de PBS 50 + Tween 20 0,1 % sont réalisés, puis les anticorps secondaires couplés à la peroxydase et dilués 1000x dans du PBS 50 + Gloria 1 % sont aussi incubés pendant une heure. On rince 4x avec du PBS 50 + Tween 20 0,1 % avant la révélation qui consiste à incuber 100 µl de TMB dans chaque puits durant 10 minutes à l'abri de la lumière et ensuite à y ajouter 100 µl de solution STOP. Enfin, la densité optique est lue à 450 nm avec une référence à 655 nm.

## 5. Etude de la synthèse protéique par incorporation de leucine tritiée

### 5.1. Incorporation de leucine tritiée

#### ➤ Principe

Pour estimer la synthèse protéique, on ajoute un acide aminé tritié au milieu de culture normal. Ensuite, après l'extraction protéique du tapis cellulaire, on comptera la radioactivité incorporée lors de la synthèse protéique à l'aide d'un compteur à scintillation qui nous donnera une réponse en cpm (coups par minute). Cette donnée pourra être convertie en cpm/µg de protéines après avoir réalisé un dosage de protéines selon la méthode de Bradford.

### ➤ Matériel

- **Leucine tritiée 1 mCi/ml (Dupont, #NET 135 H, Boston, USA)**
- **Milieu de culture DHG (Gibco BRL, #41966-029, Paisley, Grande-Bretagne) + 1 % HS (Gibco BRL, #16050-080, Paisley, Grande-Bretagne) avec ou sans créatine**

### ➤ Méthode

Au moment de changer le milieu de culture pour enclencher la différenciation myogénique, c'est-à-dire lorsque les cellules C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> sont à 90 % de confluence, on incorpore 1 µCi de leucine tritiée par ml de milieu de culture. Comme pour une culture classique, le milieu contenant la leucine tritiée sera renouvelé tous les deux jours.

## **5.2. Extraction protéique et comptage de la radioactivité**

### **5.2.1. Extraction protéique**

#### ➤ Matériel

- **NaOH 1N**
- **HCl 1N**
- **Leucine non radioactive (Merck, Darmstadt, Allemagne)**
- **TCA 10 % (Acide trichloroacétique, Merck, Darmstadt, Allemagne)**
- **PBS : 10 mM tampon phosphate, pH 7,4, 0,9 % NaCl**
- **Liquide scintillant (Aqua Luma, Lumac LSC, Pays-Bas)**
- **Compteur à scintillation (Packard, Downers Grove, USA)**
- **DHG (Gibco BRL, #41966-029, Paisley, Grande-Bretagne) + 1 % HS (Gibco BRL, #16050-080, Paisley, Grande-Bretagne)**
- **Mélange éthanol/éther avec un rapport de volume 3/1**

#### ➤ Méthode

Chaque boîte est rincée 2x avec 2 ml de PBS + leucine 10<sup>-4</sup> M (4°C). Ensuite, on incube la boîte avec 2 ml de TCA 10 % + leucine 10<sup>-4</sup> M pendant 2 heures en chambre froide, afin de précipiter les protéines.

La boîte est ensuite rincée 1x avec 2 ml de TCA 10 % + leucine 10<sup>-4</sup> M et 2x avec 2 ml du mélange éthanol/éther 3/1 et séchée à l'air libre. Les protéines sont enfin solubilisées dans 1 ml de NaOH 1 N à 37°C durant au moins 30 minutes.

Le lysat est récupéré dans un microtube et appelé Solution A ; celle-ci servira au comptage de la radioactivité.

### 5.2.2. Comptage de la radioactivité

100 µl de Solution A sont neutralisés par 100 µl de HCl 1 N et ajoutés à 5 ml liquide scintillant.

Après avoir mélangé le tout, la radioactivité contenue dans les fioles est comptée dans le compteur à scintillation (Programme TRITIUM).

## 6. Marquage immunocytochimique

### ➤ Principe

Cette technique sert à mettre en évidence la présence et la localisation subcellulaire d'antigènes particuliers via la reconnaissance spécifique qui existe entre d'une part, un antigène cellulaire et un anticorps primaire dirigé contre celui-ci, et d'autre part, cet anticorps primaire et un anticorps secondaire reconnaissant le fragment Fc du premier. Cet anticorps secondaire est généralement couplé à une sonde fluorescente (comme les sondes Alexa) qui émet un signal fluorescent lorsqu'elle est excitée à une longueur d'onde bien déterminée.

### ➤ Matériel

- **PBS** : 10 mM tampon phosphate, pH 7,4, 0,9 % NaCl
- **Paraformaldéhyde 4 %** (Paraformaldéhyde) (**Merck**, Darmstadt, Allemagne) préparé dans du PBS (10 mM tampon phosphate, pH 7,4, 0,9 % NaCl).  
4 g de paraformaldéhyde sont chauffés à 80°C dans 100 ml de PBS, puis, la solution obtenue est fractionnée et congelée en vue de sa conservation.
- **Triton X 100** (**Merck**, Darmstadt, Allemagne)
- **BSA** (Bovine Serum Albumin) (**Sigma**, #100K1355, Saint-Louis, USA)
- **Anticorps anti-Myogénine** : anticorps monoclonal de souris (**PharMingen**, #556358, USA)
- **Anticorps anti-Myf6** : anticorps polyclonal de lapin (SC-784, **Santa-Cruz**, USA)
- **Anticorps anti-Myf5** : anticorps polyclonal de lapin (SC-302, **Santa-Cruz**, USA)
- **Anticorps anti-AnnexineII (B et D)**, #A-14020, USA)
- **Anticorps secondaire anti-Ig de lapin couplé à une sonde Alexa rouge** (Abs : 578 nm; Em : 603 nm) ou **verte** (Abs : 495 nm; Em : 519 nm) (**Molecular Probes**, #A-11008 ou #A-11011, USA)
- **Anticorps secondaire anti-Ig de souris couplé à une sonde Alexa rouge** ( Abs : 578 nm; Em : 603 nm) ou **verte** (Abs : 495 nm; Em : 519 nm) (**Molecular Probes**, #A-11004 ou #A-11001)
- **TO-PRO 3** (**Molecular Probes**, #T-3605, USA) (Abs : 642 nm- Em : 661 nm)

- **Mowiol (Calbiochem, #475904, USA)** : 0,1 g de Mowiol par ml d'une solution Tris 0,2 M, pH 8,5 + 22 % de glycérol. L'ensemble est agité et chauffé à 50°C (o/n) jusqu'à dissolution.
- **Microscope confocal Leica (Leica, Heidelberg, Allemagne)**

## ➤ Méthode

Les cellulesensemencées sur des couvre-objets sont rincées 1x avec du PBS puis fixées dans du paraformaldéhyde 4 % pendant 10 minutes. Ensuite, 3 lavages avec du PBS sont effectués et les cellules sont perméabilisées 5 minutes dans du PBS + Triton 0,1 %. Trois lavages avec du PBS + BSA 1 % sont encore nécessaires avant une incubation de 2 heures avec 30 µl de l'anticorps primaire choisi, qui aura été dilué 100x dans du PBS + BSA 1 %. A la suite de cette incubation, 3 rinçages avec du PBS + BSA 1 % ont lieu, puis une incubation de 45 minutes, à l'abri de la lumière, dans 30 µl d'anticorps secondaires dilués 1000x dans du PBS + BSA 1 %. Trois lavages avec du PBS suivent cette incubation, à la suite de quoi, un marquage au TO-PRO 3 liant l'ADN double brin et permettant donc de visualiser le noyau, peut être réalisé pendant 30 minutes. Celui-ci est dilué 80x dans du PBS contenant 2 mg de RNase par ml. Après une dernière série de rinçages, les lamelles sont montées sur des lames porte-objets, à l'aide de Mowiol qui aura été préchauffé à 56°C. Les incubations en présence d'anticorps primaires et secondaires ainsi qu'avec le TO-PRO 3 sont réalisés en retournant les lamelles couvre-objets sur une goutte de solution d'anticorps alors que les rinçages sont effectués dans les puits d'une plaque 24 puits.

La visualisation du (des) marquage(s) se fera alors à l'aide du microscope confocal, en choisissant les longueurs d'onde utilisées pour la détection, en fonction des sondes Alexa couplées aux anticorps secondaires choisis.



Bibliographie

- Andreucci, J.J., Grant, D., Cox, D.M., Tomc, L.K., Prywes, R., Goldhamer, D.J., Rodrigues, N., Bedard, P.A. and McDermott, J.C. (2002) Composition and function of AP-1 transcription complexes during muscle cell differentiation. *J Biol Chem*, **277**, 16426-16432.
- Arnold, H.H. and Winter, B. (1998) Muscle differentiation: more complexity to the network of myogenic regulators. *Curr Opin Genet Dev*, **8**, 539-544.
- Bailey, P., Holowacz, T. and Lassar, A.B. (2001) The origin of skeletal muscle stem cells in the embryo and the adult. *Curr Opin Cell Biol*, **13**, 679-689.
- Berneis, K., Ninnis, R., Haussinger, D. and Keller, U. (1999) Effects of hyper- and hyposmolality on whole body protein and glucose kinetics in humans. *Am J Physiol*, **276**, E188-195.
- Brazil, D.P. and Hemmings, B.A. (2001) Ten years of protein kinase B signalling: a hard Akt to follow. *Trends Biochem Sci*, **26**, 657-664.
- Coolican, S.A., Samuel, D.S., Ewton, D.Z., McWade, F.J. and Florini, J.R. (1997) The mitogenic and myogenic actions of insulin-like growth factors utilize distinct signaling pathways. *J Biol Chem*, **272**, 6653-6662.
- Cuenda, A. Cohen, P. (1999) Stress-activated protein kinase-2/p38 and a rapamycin-sensitive pathway are required for C2C12 myogenesis. *J Biol Chem*, **274**, 4341-6
- Derave, W., Eijnde, B.O. and Hespel, P. (2003) Creatine supplementation in health and disease: what is the evidence for long-term efficacy? *Mol Cell Biochem*, **244**, 49-55.
- Grimaldi, P.A., Teboul, L., Inadera, H., Gaillard, D. and Amri, E.Z. (1997) Trans-differentiation of myoblasts to adipoblasts: triggering effects of fatty acids and thiazolidinediones. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, **57**, 71-75.
- Gu, W., Schneider, J.W., Condorelli, G., Kaushal, S., Mahdavi, V. and Nadal-Ginard, B. (1993) Interaction of myogenic factors and the retinoblastoma protein mediates muscle cell commitment and differentiation. *Cell*, **72**, 309-324.
- Guo, K., Wang, J., Andres, V., Smith, R.C. and Walsh, K. (1995) MyoD-induced expression of p21 inhibits cyclin-dependent kinase activity upon myocyte terminal differentiation. *Mol Cell Biol*, **15**, 3823-3829.
- Hespel, P., Op't Eijnde, B., Van Leemputte, M., Urso, B., Greenhaff, P.L., Labarque, V., Dymarkowski, S., Van Hecke, P. and Richter, E.A. (2001) Oral creatine supplementation facilitates the rehabilitation of disuse atrophy and alters the expression of muscle myogenic factors in humans. *J Physiol*, **536**, 625-633.
- Hinoi, E., Balcar, V.J., Kuramoto, N., Nakamichi, N. and Yoneda, Y. (2002) Nuclear transcription factors in the hippocampus. *Prog Neurobiol*, **68**, 145-165.
- Ingwall, J.S., Weiner, C.D., Morales, M.F., Davis, E. and Stockdale, F.E. (1974) Specificity of creatine in the control of muscle protein synthesis. *J Cell Biol*, **62**, 145-151.
- Jiang, B. H. Aoki, M. Zheng, J. Z. Li, J. Vogt, P. K. (1999) Myogenic signaling of phosphatidylinositol 3-kinase requires the serine-threonine kinase Akt/protein kinase B. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 2077-2081.
- Kaliman, P., Canicio, J., Shepherd, P.R., Beeton, C.A., Testar, X., Palacin, M. and Zorzano, A. (1998) Insulin-like growth factors require phosphatidylinositol 3-kinase to signal myogenesis: dominant negative p85 expression blocks differentiation of L6E9 muscle cells. *Mol Endocrinol*, **12**, 66-77.
- Kaliman, P., Vinals, F., Testar, X., Palacin, M. and Zorzano, A. (1996) Phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors block differentiation of skeletal muscle cells. *J Biol Chem*, **271**, 19146-19151.

- Kreider, R.B. (2003) Effects of creatine supplementation on performance and training adaptations. *Mol Cell Biochem*, **244**, 89-94.
- Lassar, A. and Munsterberg, A. (1994) Wiring diagrams: regulatory circuits and the control of skeletal myogenesis. *Curr Opin Cell Biol*, **6**, 432-442.
- Li, Y., Jiang, B., Ensign, W.Y., Vogt, P.K. and Han, J. (2000) Myogenic differentiation requires signalling through both phosphatidylinositol 3-kinase and p38 MAP kinase. *Cell Signal*, **12**, 751-757.
- Louis, M., Lebacqz, J., Poortmans, J.R., Belpaire-Dethiou, M.C., Devogelaer, J.P., Van Hecke, P., Goubel, F. and Francaux, M. (2003) Beneficial effects of creatine supplementation in dystrophic patients. *Muscle Nerve*, **27**, 604-610.
- McKinsey, T.A., Zhang, C.L. and Olson, E.N. (2001) Control of muscle development by dueling HATs and HDACs. *Curr Opin Genet Dev*, **11**, 497-504.
- Montarras, D., Chelly, J., Bober, E., Arnold, H., Ott, M.O., Gros, F. and Pinset, C. (1991) Developmental patterns in the expression of Myf5, MyoD, myogenin, and MRF4 during myogenesis. *New Biol*, **3**, 592-600.
- Munsterberg, A.E., Kitajewski, J., Bumcrot, D.A., McMahon, A.P. and Lassar, A.B. (1995) Combinatorial signaling by Sonic hedgehog and Wnt family members induces myogenic bHLH gene expression in the somite. *Genes Dev*, **9**, 2911-2922.
- Naya, F.S. and Olson, E. (1999) MEF2: a transcriptional target for signaling pathways controlling skeletal muscle growth and differentiation. *Curr Opin Cell Biol*, **11**, 683-688.
- Persky, A.M. and Brazeau, G.A. (2001) Clinical pharmacology of the dietary supplement creatine monohydrate. *Pharmacol Rev*, **53**, 161-176.
- Poortmans, J.R. and Francaux, M. (1998) Renal dysfunction accompanying oral creatine supplements. *Lancet*, **352**, 234.
- Psilander, N., Damsgaard, R. and Pilegaard, H. (2003) Resistance exercise alters MRF and IGF-I mRNA content in human skeletal muscle. *J Appl Physiol*.
- Puri, P.L., Avantaggiati, M.L., Balsano, C., Sang, N., Graessmann, A., Giordano, A. and Levvero, M. (1997) p300 is required for MyoD-dependent cell cycle arrest and muscle-specific gene transcription. *Embo J*, **16**, 369-383.
- Puri, P.L. and Sartorelli, V. (2000) Regulation of muscle regulatory factors by DNA-binding, interacting proteins, and post-transcriptional modifications. *J Cell Physiol*, **185**, 155-173.
- Rawls, A., Valdez, M.R., Zhang, W., Richardson, J., Klein, W.H. and Olson, E.N. (1998) Overlapping functions of the myogenic bHLH genes MRF4 and MyoD revealed in double mutant mice. *Development*, **125**, 2349-2358.
- Ronald, L. Terjung, P. D. Clarkson, P. Eichner, E. R. Greenhaff, P. L. Hespel, P. J. Israel, R. G. Kraemer, W. J. Wagenmakers, A. J. M. Williams, M. H. (2000) Supplémentation orale en créatine : effets physiologiques et sanitaires. *Med Sci Sports Exerc*, **3**, 706-717
- Rudnicki, M.A., Schnegelsberg, P.N., Stead, R.H., Braun, T., Arnold, H.H. and Jaenisch, R. (1993) MyoD or Myf-5 is required for the formation of skeletal muscle. *Cell*, **75**, 1351-1359.
- Seale, P., Asakura, A. and Rudnicki, M.A. (2001) The potential of muscle stem cells. *Dev Cell*, **1**, 333-342.
- Song, A., Wang, Q., Goebel, M.G. and Harrington, M.A. (1998) Phosphorylation of nuclear MyoD is required for its rapid degradation. *Mol Cell Biol*, **18**, 4994-4999.
- Sumitani, S., Goya, K., Testa, J.R., Kouhara, H. and Kasayama, S. (2002) Akt1 and Akt2 differently regulate muscle creatine kinase and myogenin gene transcription in insulin-induced differentiation of C2C12 myoblasts. *Endocrinology*, **143**, 820-828.

- Tamir, Y. and Bengal, E. (2000) Phosphoinositide 3-kinase induces the transcriptional activity of MEF2 proteins during muscle differentiation. *J Biol Chem*, **275**, 34424-34432.
- Thiebault, C. (1998) L'enfant et le sport. De Boeck, pp462
- Tarnopolsky, M. and Martin, J. (1999) Creatine monohydrate increases strength in patients with neuromuscular disease. *Neurology*, **52**, 854-857.
- Vandenberghe, K., Goris, M., Van Hecke, P., Van Leemputte, M., Vangerven, L. and Hespel, P. (1997) Long-term creatine intake is beneficial to muscle performance during resistance training. *J Appl Physiol*, **83**, 2055-2063.
- Vierck, J.L., Icenogle, D.L., Bucci, L. and Dodson, M.V. (2003) The effects of ergogenic compounds on myogenic satellite cells. *Med Sci Sports Exerc*, **35**, 769-776.
- Wei, Q. and Paterson, B.M. (2001) Regulation of MyoD function in the dividing myoblast. *FEBS Lett*, **490**, 171-178.
- Wyss, M. and Kaddurah-Daouk, R. (2000) Creatine and creatinine metabolism. *Physiol Rev*, **80**, 1107-1213.
- Xu, Q. and Wu, Z. (2000) The insulin-like growth factor-phosphatidylinositol 3-kinase-Akt signaling pathway regulates myogenin expression in normal myogenic cells but not in rhabdomyosarcoma-derived RD cells. *J Biol Chem*, **275**, 36750-36757.
- Yoshida, N., Yoshida, S., Koishi, K., Masuda, K. and Nabeshima, Y. (1998) Cell heterogeneity upon myogenic differentiation: down-regulation of MyoD and Myf-5 generates 'reserve cells'. *J Cell Sci*, **111** ( Pt 6), 769-779.
- Yun, K. and Wold, B. (1996) Skeletal muscle determination and differentiation: story of a core regulatory network and its context. *Curr Opin Cell Biol*, **8**, 877-889.
- Zhang, W., Behringer, R.R. and Olson, E.N. (1995) Inactivation of the myogenic bHLH gene MRF4 results in up-regulation of myogenin and rib anomalies. *Genes Dev*, **9**, 1388-1399.