



**HAL**  
open science

# Rôle des facteurs de transcription SREBP-1 dans la fonction musculaire : implication des répresseurs transcriptionnels BHLHB2 et BHLHB3

Virginie Lecomte

► **To cite this version:**

Virginie Lecomte. Rôle des facteurs de transcription SREBP-1 dans la fonction musculaire : implication des répresseurs transcriptionnels BHLHB2 et BHLHB3. Sciences agricoles. Université Claude Bernard - Lyon I, 2009. Français. NNT : 2009LYO10212 . tel-00583077

**HAL Id: tel-00583077**

**<https://theses.hal.science/tel-00583077>**

Submitted on 4 Apr 2011

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

N° d'ordre : 212-2009

Année 2009

THESE DE L'UNIVERSITE DE LYON

Présentée devant

L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

L'ECOLE DOCTORALE INTERDISCIPLINAIRE SCIENCES-SANTE

pour l'obtention du

DIPLOME DE DOCTORAT

(arrêté du 7 août 2006)

par

Virginie LECOMTE

**Rôle des facteurs de transcription SREBP-1  
dans la fonction musculaire :  
Implication des répresseurs transcriptionnels BHLHB2 et BHLHB3.**

Directeur de thèse : Dr Etienne Lefai

Soutenue publiquement le 20 Novembre 2009, devant un jury composé de

Pr Chantal Simon	Présidente
Pr Xavier Bigard	Rapporteur
Dr Dominique Dardevet	Rapporteur
Dr Damien Freyssenet	Examineur
Dr Etienne Lefai	Directeur de thèse









## Remerciements

*Pour commencer ce (long) manuscrit, je sacrifie au traditionnel exercice des remerciements. Etudiante en tout début de thèse, je considérais cet exercice inutile et futile, même si ces quelques pages sont toujours les plus réjouissantes à lire d'un manuscrit de thèse. Mais alors que cette belle (mais parfois difficile) aventure qu'a été ma thèse touche à sa fin, après plus de quatre ans, je me rends compte que de sincères remerciements s'imposent. Car sans avoir été bien entourée, professionnellement comme personnellement, les obstacles auraient été plus difficiles à franchir.*

*Merci donc à tous ceux qui ont participé de près, de très près ou de plus loin à cette aventure.*

*A Madame le Professeur Chantal Simon pour avoir accepté de présider le jury de ma soutenance de thèse.*

*Au Professeur Xavier Bigard et au Docteur Dominique Dardevet pour avoir accepté d'être rapporteurs de ce travail et de m'accorder un peu de leur précieux temps.*

*Au Docteur Damien Freyssenet, pour avoir accepté d'examiner ce travail, auquel il a apporté son aide précieuse, en nous accueillant dans ces locaux à Saint Etienne et en nous initiant à l'étude in vivo du muscle chez la souris. Pour son habileté à l'injection intramusculaire et à la dissection.*

*Au Docteur Hubert Vidal pour m'avoir accueilli dans son unité, ou recueillie devrais-je plutôt dire, après une première année de thèse avortée. Pour avoir eu confiance dans mes capacités à rebondir et à m'adapter.*

*A Etienne, à qui je décerne ici le prix du meilleur directeur de thèse. Il n'aime ni les honneurs, ni les compliments, il me répondrait donc certainement que ce paragraphe est inutile car il n'a fait que son travail. Seulement voilà, il le fait bien. Avec une grande pédagogie. Toujours disponible mais pas trop présent. Sachant remotiver ses troupes lorsque le moral scientifique est à la baisse. Se réjouissant avec nous (parfois même plus que nous) d'un beau résultat. Enthousiaste et passionné. Merci de m'avoir transmis ton savoir moléculaire et ton goût de la « Bonne Science ». J'espère avoir été à la hauteur de ton exigence scientifique au cours de ces trois années.*

*A l'ensemble des membres de l'U449 puis de l'U870 pour entretenir l'esprit accueillant et l'ambiance conviviale de ce laboratoire.*

*Aux chercheurs de l'unité, Sophie, avec qui j'ai partagé une fructueuse collaboration, mais aussi Anne-Marie, Jennifer, Brigitte, Georges ainsi que Martine et Danielle qui nous ont récemment rejoints, toujours disponibles pour livrer conseils avisés et encouragements.*

*A tous ceux qui m'ont accompagnée au cours de cette thèse.*

*A la Amsterdam team, fine équipe.*

*Avec par ordre alphabétique pour ne vexer personne:*

*Amélie, appellation scientifique : Homo Teckelus, animal au premier abord un peu revêche et quelque peu agressif, mais qui se révèle avoir un fond gentil et un tempérament de clown... Oups ! Pas trop de compliments car a une tendance au gonflement des chevilles très rapide (si, si, à en faire craquer les fermetures éclairs de ses bottines...) Pour soigner une crise intempestive, tu peux toujours composer mon numéro en urgence, au besoin je me déplace. A nos soirées partagées à pratiquer le grimelin, l'alien et mon préféré, la marmotte... Tout ce petit bestiaire bien sympathique va me manquer... Ils sont tous si attachants...*

*Cécile, ses « ça m'agace » dégénérant au file de la journée en « ça me soûle, ça me re-soûle » puis « ça me b... ! » (L'expression est bien trop vulgaire, surtout pour les gens du Sud paraît il, pour être ici inscrite), ont rythmé la vie de notre bureau, au son de ce discret mais si charmant petit accent Aurillacois. Mais ces petites râleries n'entament en rien la bonne humeur perpétuelle de ce petit bout de femme dynamique et pétillant avec qui le fou rire n'est jamais loin. A nos échanges de fromages de nos régions respectives, elle, Le Cantal, moi, La Savoie, bref ce qui ce fait de meilleur en France, en Europe et dans le monde je pense. Combien de fois auront-nous soupiré ensemble pour un bon morceau de fromage accompagné bien sûr d'un bon verre de vin ! A nos discussions, passées et surtout prochaines, sur les nombreux plaisirs de la vie...*

*Diane, « caillera de la téci nantérienne » qui a fait ses classes avec la bourgeoisie Neuillienne (en compagnie de la nièce Sarkozy... si besoins de piston), la parisienne, pardon, la banlieusarde du labo, qui a finit par quand même trouver des avantages à la vie lyonnaise : mais oui à Lyon on a des musées, des théâtres, des salles de concert et même des cinémas multiplexes et en plus les films sortent en même temps qu'à Paris... Z'auréole un peu ricaine sur les bords (un séjour aux states en pleine adolescence laisse des traces...), c'est un joli melting pot culturel à elle toute seule... Bonjour à ta grande sœur, le futur docteur en lettre « pff ! », quand tu iras la voir (pas) au Texas. Et surtout, Nanterre pas tes Rêves !!!*

*Manu, le Manu de Diane, pour l'identifier, car dans le labo, trois Manu différents cohabitent, la Petite, la Grande, et... Le Manu de Diane. Certes ce surnom fait un peu « Homme objet », mais il aime ça apparemment, jusqu'à partir en vacances avec 5 filles un peu allumées. Et oui c'est lui l'homme de la Amsterdam team, qui a supporté avec patience et docilité une bande de fille en goguette accros au shopping et aux discussions de chiffons... j'espère que cette expérience, n'aura pas été trop traumatisante. Merci pour le petit coup de pouce chocolat quand j'en avais besoin, mais chut... il ne faut pas trop ébruiter cette réserve secrète...*

*Sévy, Mamy pour les intimes... mais qui est restée très, très jeune dans sa tête. Faut dire que la compagnie des jeunettes du fond du labo, ça conserve la vivacité d'esprit ! La ch'ti du labo, d'origine picarde certifiée (ça maîtrise du patois le confirme), elle a la gentillesse et la générosité des gens de là-bas. Comment ça le prince charmant ne l'a pas encore trouvée ? C'est que ce n'est pas évident de la suivre : de la Louisiane à Melbourne, de Lyon Sud à Oxford pour peut-être se poser enfin à Paris. Globe trotteuse qui aura réveillé mes anciens rêves d'Australie grâce à son enthousiasme communicatif pour ce pays... Et oui la fautive c'est elle si maintenant à mon tour j'ai envie d'aller rendre visite aux kangourous... d'ailleurs si t'en connais deux ou trois sympas qui pourraient me trouver un job...*

*A Rami, qui aurait eu sa place dans la Amsterdam team s'il était arrivé au labo dans le bon timing. Le transfuge libanais de la Doua à Lyon Sud. Tant pis pour les Villeurbannais, maintenant c'est nous qui profitons de sa bonne humeur, de son humour, de son bavardage... et de sa mauvaise fois. Une bonne recrue tout de même dans notre bureau, dont nous avons fais, avec Cécile, petit à petit l'éducation. Il tient à cultiver son image d'homme fort libanais à coup d'expressions machistes : « Faîtes votre travail les filles », lorsque nous rangions notre bureau ou vidions les poubelles, « Euh...j'ai besoin de toi, tu peux m'aider » en me montrant une montagne de vaisselle sale...Mais ce n'est qu'une façade, une fois, il nous a même fait la notre, de vaisselle !*

*A Sara, qui a délibérément refusé de faire parti de la Amsterdam team. Comment ça tu as déjà pris un mois de vacances pour partir à Tahiti, ça te suffit? Avec ses cheveux blonds et ses grands yeux bleus, c'est la Miss Finlande (suédophone) du labo. Mon prédécesseur en tant que Docteur, elle m'aura montré la voie dans les affres de la rédaction puis de la soutenance de thèse...Malheureusement tout le monde ne peut avoir son flegme et son stoïsme nordique devant cette épreuve !*

*A Cyrille, qui forme déjà une team avec Aurélie, Orelly pour les intimes : c'est le scoop de l'année ! Eux aussi ont rendu visite aux kangourous pour passer un petit mois de vacance en leur compagnie. Le mélomane du labo, à la voix qui pourrait fêler un verre. Joueur de piano et gratouilleur de guitare ; on espère pouvoir assister à un concert de Noël, toi au piano, Diane à l'alto, Amélie à la flûte traversière et Cécile à la clarinette...prévenez-moi pour la résa. C'est également un amateur de bon vin (de bonnes bières belges aussi) et de bonne chère, jamais avare d'un conseil culinaire ou d'un bon plan viticole.*

*A Manu, la grande, grande prêtresse des puces ADN. C'est à elle que je dois une partie des beaux résultats qui sont présentés ci-après. C'est également la gardienne du Serveur U870, coffre-fort renfermant les trésors du labo, nécessitant une surveillance constante. Elle aussi nous a abandonné un temps pour allez travailler chez les kangourous (A croire qu'au labo on à des vols directs Lyon-Sud/ Australia). Son retour était attendu de pieds ferme, le serveur était orphelin sans sa nounou !*

*A Manu, la petite, Sandra et Vanessa, les trois drôle de dames du labo (mais qui est Charly ?), équipe technique de choc. Manu, la dompteuse de Light Cycler<sup>®</sup> à l'époque et de Rotorgene<sup>®</sup> maintenant, il faut bien évoluer avec la technologie. Sandra, disciple appliquée de la grande prêtresse des puces ADN, les spots tremblent devant son œil aiguisé. Vanessa, « Miss Qualité », qui fût souvent mes mains pour la qPCR, les nombreux clonages et autres réjouissances de biologie moléculaire...Et ses mains sont en or. Travailler avec toi fût un plaisir.*

*A Annie, Christine, Marie-Agnès et Nathalie, le deuxième bureau technique, pour leur efficacité, leur disponibilité, leur bonne humeur et leur coup de gueule parfois nécessaires.*

*A l'équipe de l'ex-U407. Et oui je ne peux omettre de remercier ici ma première famille de thèse. Une famille avec ses joies à partager tous ensemble, sa solidarité devant les difficultés mais également ses conflits et ses ruptures comme dans toutes les grandes familles. Cette famille m'aura permis de rencontrer une autre fine équipe. Merci à Aurélie, Aurélien, Léo, Marie, Kriztian et Emilie pour leur précieuse amitié. Cette famille m'aura également permis de faire une des plus belles rencontres ...*

*A Pierre, merci suffit-il seulement? Pour ton soutien, ta patience et ta compréhension... pas toujours facile de comprendre les états d'âme d'un futur docteur. Pour ton aide précieuse au quotidien. Pour rendre tous les jours ma vie plus douce...*

*Enfin, à mes parents bien-sûr, et même si cela fait un peu cliché, sans qui je n'en serais jamais arrivée là. Merci pour leur soutien sans faille au cours de ces années ; merci pour leur encouragements à toujours faire ce que j'aimais alors même que tout le monde me déconseillait de suivre cette voie ; merci pour leur confiance dans mes choix, pas toujours évidents ; merci de m'avoir laissé faire mes propres erreurs et merci aussi pour m'avoir aidé à les réaliser ; merci d'être toujours présents (même trop).MERCI.*

*Et puis, à toi courageux lecteur, que l'épaisseur du manuscrit n'aura pas effrayé. Ne t'arrête pas en si bon chemin, tourne encore quelques pages...leur lecture n'est pas si ardue.*





# Table des Matières

Remerciements.....	5
Table des Matières.....	11
Liste des Abréviations.....	16
Table des Illustrations.....	19
<b>INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE.....</b>	<b>23</b>
<b>INTRODUCTION GENERALE.....</b>	<b>25</b>
<b>ETAT DE LA LITTERATURE.....</b>	<b>29</b>
<b>1. Les MRF, facteurs bHLH dans le muscle squelettique.....</b>	<b>30</b>
<b>1.1. Les MRF, régulateurs de la myogenèse.....</b>	<b>30</b>
1.1.1. Les propriétés structurales des MRF.....	31
1.1.2. Interaction entre les MRF et les protéines MEF2.....	37
1.1.3. Régulations de l'activité des MRF.....	40
a) Régulation par les facteurs de croissance.....	40
b) Régulation des MRF au cours du cycle cellulaire.....	44
c) Rôle des co-régulateurs transcriptionnels.....	48
<b>1.2. Les MRF dans la myogenèse embryonnaire.....</b>	<b>51</b>
1.2.1. Mécanismes de la myogenèse.....	51
1.2.2. Expression des MRF au cours de la myogenèse.....	54
1.2.3. Rôle des MRF dans la myogenèse : apport des souris transgéniques.....	57
<b>1.3. Les MRF dans la régénération musculaire.....</b>	<b>60</b>
1.3.1. Nature et Origine des cellules satellites.....	61
1.3.2. Activation, différenciation et renouvellement des cellules satellites.....	63
<b>1.4. Les MRF dans le contrôle de la masse musculaire.....</b>	<b>66</b>
1.4.1. Plasticité musculaire.....	66
1.4.2. Implication des MRF dans la régulation de la masse musculaire.....	66
1.4.3. Implication des MRF dans la régulation du phénotype des fibres musculaires.....	70
1.4.4. Autres acteurs du contrôle de la masse musculaire.....	76
<b>2. Les répresseurs transcriptionnels BHLHB2 et BHLHB3.....</b>	<b>79</b>
<b>2.1. BHLHB2 et BHLHB3 : Structure et Fonction.....</b>	<b>81</b>
2.1.1. Structure protéique.....	81
a) BHLHB2 et bHLH3 : une nouvelle famille de protéines.....	81
b) Différence et homologie entre BHLHB2 et BHLHB3.....	82
c) Le domaine Orange.....	83
2.1.2. Bases moléculaires de la répression transcriptionnelle par BHLHB2/B3.....	83



a) Liaison aux motifs E-Box .....	83
b) Recrutement de co-répresseurs .....	84
c) Autres mécanismes : interactions protéiques .....	85
2.1.3. Structure et régulation de l'expression des gènes BHLHB2 et BHLHB3 .....	88
2.1.4. Régulation réciproque et autorégulation .....	89
<b>2.2. Implications physiologiques de BHLHB2 et BHLHB3 .....</b>	<b>91</b>
2.2.1. Expression de BHLHB2 et BHLHB3 au cours du développement .....	93
2.2.2. Régulateurs de la croissance et de la différenciation cellulaire .....	93
a) Différenciation neuronale .....	95
b) Chondrogenèse et Ostéogenèse .....	95
c) Adipogenèse .....	96
2.2.3. BHLHB2 et BHLHB3 dans le muscle squelettique .....	97
a) Expression musculaire <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> .....	97
b) Implication dans la myogenèse .....	98
➤ Inhibition de la différenciation myogénique .....	98
➤ Activation des cellules satellites .....	102
c) Régulations métaboliques .....	106
➤ Régulation par l'insuline .....	106
➤ Régulation par l'AMPKinase .....	107
<b>3. Les facteurs de transcription SREBP : bHLH particuliers .....</b>	<b>109</b>
<b>3.1. Description, Structure, Fonction .....</b>	<b>110</b>
3.1.1. SREBP: bHLH-LZ particuliers .....	110
3.1.2. Deux gènes, trois protéines .....	113
3.1.3. Du précurseur à la forme nucléaire .....	115
a) SCAP : escorte de SREBP du RE au Golgi .....	115
b) Insig : rétention de SREBP au sein du RE .....	116
c) S1P, S2P : clivage protéolytique de SREBP .....	117
d) Importines $\beta$ : import nucléaire .....	118
3.1.4. SREBP : régulateurs clé du métabolisme lipidique .....	120
3.1.5. Régulation de l'activité transcriptionnelle de SREBP .....	124
<b>3.2. Les facteurs SREBP dans le muscle squelettique .....</b>	<b>127</b>
3.2.1. Régulations nutritionnelles de SREBP-1 dans le muscle .....	128
a) Effet du statut nutritionnel .....	128
b) Régulation transcriptionnelle par LXR/RXR .....	130
c) Régulation nutriment-spécifique .....	134
➤ Régulation par les acides gras .....	134
➤ Régulation par le glucose .....	135
3.2.2. SREBP-1 : médiateur des effets de l'insuline dans le muscle squelettique .....	138
a) Action de l'insuline .....	138
b) SREBP-1c : médiateurs des effets géniques de l'insuline .....	140
c) Implications de SREBP-1c dans l'insulino-résistance musculaire .....	144
➤ Définition et mécanismes de l'insulino-résistance .....	144
➤ Implications de SREBP-1c dans l'insulino-résistance .....	148
3.2.3. Influence de l'exercice sur l'expression musculaire de SREBP-1c .....	151
<b>4. Conclusion .....</b>	<b>154</b>

<b>TRAVAUX PERSONNELS</b> .....	157
<b>PRESENTATION DU TRAVAIL DE THESE</b> .....	159
<b>MATERIEL ET METHODES</b> .....	161
<b>1. Modèles cellulaires</b> .....	161
<b>1.1. Cellules musculaires humaines en culture primaire</b> .....	161
1.1.1. Matériel.....	161
1.1.2. Mise en Culture et Sélection des cellules musculaires.....	163
1.1.3. Obtention de myotubes polynucléés.....	165
<b>1.2. Lignées musculaires humaines</b> .....	165
1.2.1. Lignée HEK 293.....	165
1.2.2. Lignée HepG2.....	166
<b>2. Modulation de l'expression de protéines d'intérêt <i>In vitro</i></b> .....	167
<b>2.1. Mise au point d'adénovirus recombinants</b> .....	167
2.1.1. Construction d'adénovirus recombinants ( $\Delta E1/E3$ ).....	169
a) Clonage des gènes humains codant pour SREBP-1a, SREBP-1c, BHLHB2, BHLHB3.....	169
b) Génération des Adénovirus recombinant codant pour SREBP-1a, SREBP-1c, BHLHB2 et BHLHB3.....	170
c) Amplification de l'adénovirus.....	171
d) Titration.....	172
2.1.2. Infection de cellules musculaires humaines par adénovirus recombinants.....	173
<b>2.2. Interférence ARN</b> .....	173
<b>3. Surexpression de protéines <i>In vivo</i> dans le muscle de souris</b> .....	174
<b>3.1. Les animaux</b> .....	175
<b>3.2. Injection adénovirale intramusculaire</b> .....	176
<b>3.3. Traitement des tissus</b> .....	176
<b>3.4. Observation et analyse</b> .....	177
<b>4. Etudes transcriptomiques</b> .....	177
<b>4.1. Les puces à ADN</b> .....	178
4.1.1. Définition du protocole expérimentale.....	178
4.1.2. Préparation des échantillons-cibles.....	181
a) Extraction des ARN totaux.....	181
b) Amplification des ARNm.....	181
c) Marquage des ARNa-cibles.....	181
4.1.3. Hybridation.....	182
4.1.4. Acquisition de l'image de la puce à ADN.....	182
4.1.5. Analyse des données.....	183
<b>4.2. Interprétation Biologiques des Données de Puces ADN</b> .....	183

<b>5. Mesure de l'expression Génique</b>	184
<b>5.1. Préparation des ARN</b>	184
5.1.1. Extraction	184
5.1.2. Reverse transcription	185
<b>5.2. Dosage des ARNm cibles</b>	185
<b>6. Mesure de l'expression protéique</b>	185
<b>6.1. Quantification des protéines par Western-Blot</b>	185
6.1.1. Préparation des extraits protéiques	185
6.1.2. Western Blot	186
<b>6.2. Détection des protéines par immunofluorescence</b>	186
<b>7. Etude de Promoteurs</b>	187
<b>7.1. Recherche de sites de fixation de facteurs de transcription</b>	187
<b>7.2. Immunoprécipitation de Chromatine (ChIP)</b>	187
7.2.1. Fixation et fragmentation de la chromatine	188
7.2.2. Immunoprécipitation de la chromatine	188
7.2.3. Révélation par PCR	189
<b>7.3. Mesure de l'activité promotrice par système gène rapporteur</b>	190
7.3.1. Clonage des promoteurs BHLHB2 et BHLHB3	191
7.3.2. Transfection transitoire dans les cellules musculaires humaines et HepG2	192
7.3.3. Mesure des activités promotrices	192
<b>RESULTATS EXPERIMENTAUX</b>	195
<b>Article n° 1</b>	195
Introduction	197
Discussion	199
<b>Article n° 2</b>	205
Introduction	207
Discussion	209
<b>Article n° 3</b>	213
Introduction	215
Discussion	219
<b>DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES</b>	223
<b>1. Diversité des fonctions de SREBP-1 dans le muscle squelettique</b>	225
1.1. Implications dans le métabolisme musculaire	225
1.2. Implications dans la réponse adaptative au stress extracellulaire	226

<b>2. BHLHB2 et BHLHB3 : deux nouvelles cibles directes de SREBP-1</b> .....	227
2.1. Implications dans le métabolisme musculaire.....	228
2.2. Implications dans la réponse au stress extracellulaire.....	230
<b>3. SREBP-1 : régulateur du phénotype musculaire</b> .....	231
3.1. SREBP inhibe la différenciation myogénique <i>in vitro</i> .....	232
3.2. SREBP-1 induit l'atrophie des cellules musculaires <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> .....	233
3.2.1. Régulation de la protéolyse.....	234
3.2.2. Régulation de la protéosynthèse.....	235
<b>4. BHLHB2 et BHLHB3 : médiateurs des effets répresseurs de SREBP-1 sur les cellules musculaires</b> .....	236
4.1. Implication de BHLHB3 dans la différenciation myogénique.....	237
4.2. Implication de BHLHB2 dans la différenciation myogénique.....	238
<b>5. Implications des effets anti-myogéniques et atrophiques de SREBP-1 dans le développement de pathologies musculaires</b> .....	241
<b>6. Perspectives</b> .....	245
<b>BIBLIOGRAPHIE</b> .....	249

## Liste des Abréviations

ACC	Acetyl-CoA carboxylase
ADN	Acide Déoxy-ribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
AMPc	Adénosine Mono-Phosphate cyclique
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
B/MAL1	ARNT-like protein 1, brain and muscle
bHLH	basic Helix-Loop-Helix
BHLHB2	basic helix-loop-helix domain-containing, class B, 2 protein
BHLHB3	basic helix-loop-helix domain-containing, class B, 3 protein
bHLH-LZ	basic Helix-Loop-Helix Leucine Zipper
bHLH-O	basic Helix-Loop-Helix Orange
BMP	Bone Morphogenetic Proteins
C/EBP	CCAAT/enhancer binding protein
CamK	Calcium calmodulin dependant protein kinase
CamK	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase
CARM1	Coactivator-associated Arginin Methyltransferase-1
CBF/NFY	CCAAT-binding factor/nuclear factor-Y
CBP	CREB-Binding protein
cdk	cyclin-dependant kinase
CDKI	cyclin-dependant kinase inhinbitor
ChREB	Carbohydrate Response Element binding protein
CRE	cAMP response element
CREB	CRE-Binding protein
Cry	cryptochrome (photolyase-like)
DEC1/2	differentially expressed in chondrocytes 1/2; differentiated embryo chondrocyte expressed gene 1/2
DT2	Diabète/Diabétique de type 2
FAS	Fatty Acid Syntase
FGF	Fibroblasts growth factor
GADPDH	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
GLUT4	Glucose transporter 4
GSK3	glycogène synthase kinase 3
HDAC	Histone deacetylase
HES	Hairy and Enhancer of Split
HEY	Hairy/E (spl)-related with YRPW motif
HIF	Hypoxia inducible factor
HKII	Hexokinase II
HSF	Heath Shock factor
HSP	Heath Shock protein
IGF-1	Insulin-like growth factor 1
KO	Knock Out

LDH	Lactate deshydrogenase
Mad	Mitotic arrest deficient
MADS	MCM1-agamous-deficiens-SRF related domain
MAFbx	Muscle Atrophy F-box
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
Max	MYC associated factor X
MBK1	MiniBrain Kinase (Drosophila) homolog family member -1
MCK	Muscle Creatin kinase
MEF2	Myocyte enhancer factor 2
MHC	Myosine Heavy chain
MKK5	MAPK KINASE 5
MRF	Myogenic Regulatory Factors
MRF4	Myogenic regulatory factor 4
MSP58	58-kDa microspherule protein
mTOR	mamalian target of rapamycin
MuRF	Muscle Ring Finger
Myc	myelocytomatosis viral oncogene homolog
Myf5	Myogenic factor 5
MYL	Myosine Light chain
MyoD	myoblast determination protein 1/myogenic differentiation 1
NCoR	nuclear receptor co-repressor
NFAT	nuclear factor of activated T-cells
NICD	Notch Intracellular Domain
PAS	PER/ Aryl hydrocarbon receptor translocator ARNT/Single minded SIM
PEPCK	Phosphoénolpyruvate carboxykinase
Per	Period homolog
PI3K	Phosphatidylinositol 3-kinase
PIP2	phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate
PIP3	phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate
PKA	Protéine Kinase AMPc-Dépendante
PKB	Protéine Kinase B
PKC	Protéine Kinase C
PPAR	Peroxisomes proliferator-activated receptors
Rb	produit du gène de susceptibilité au rétinoblastome
RE	Reticulum Endoplasmique
SHARP1/2	Split and Hairy-related protein 1/2
Shh	Sonic Hedgehog
SIRT1	Sirtuin (silent mating type information regulation 2 homolog) 1
Sp1	Stimulating protein 1
SRE	Sterol Response Element
SRE	Sterol Regulatory Element
SREBP	Sterol Response Element binding protein
SREBP	Sterol Regulatory Element binding protein
STAT3	signal transducer and activator of transcription 3

Stra13	stimulated with retinoic acid clone 13
TBP	Tata Box binding protein
TFIIB	general transcription factor IIB
TGF $\beta$	Transforming growth factor
TGIM	Triglycérides intra-myocytaires
TSA	Trichostatine A
UPS	Ubiquitin-proteasome system
USF	Upstream Stimulatory factor 1
Wnt	Wnt

## Table des Illustrations

<b>Figure 1:</b> Arbre phylogénétique des différentes familles des facteurs bHLH.....	28
<b>Figure 2:</b> Structure de l'homodimère formé par MyoD et une protéine E.....	32
<b>Figure 3:</b> Représentation de l'Hélice III, domaine C-terminal spécifique des MRF.....	34
<b>Figure 4:</b> Mise en évidence du « code myogénique » des MRF.....	36
<b>Figure 5:</b> Structure protéique des membres de la famille MEF2 et leur homologie dans plusieurs organismes.....	37
<b>Figure 6:</b> Différents mécanismes d'activation transcriptionnelle par MEF2 et MyoD.....	39
<b>Figure 7:</b> Différents activateurs et répresseurs de l'activité transcriptionnelle de MyoD.....	42
<b>Figure 8:</b> Régulation de l'activité transcriptionnelle de MyoD au cours du cycle cellulaire, dans les myoblastes en prolifération.....	45
<b>Figure 9:</b> Régulation du cycle cellulaire par MyoD dans les myotubes en différenciation.....	47
<b>Figure 10:</b> régulation de l'activité transcriptionnelle de MyoD par les cofacteurs transcriptionnels.....	49
<b>Figure 11:</b> Somitogénèse: différenciation du dermomyotome.....	51
<b>Figure 12:</b> Lignages myogéniques et formation des fibres musculaires.....	53
<b>Figure 13:</b> Rôle des MRF au cours de la différenciation myogénique.....	54
<b>Figure 14:</b> Régulation de l'expression des MRF au cours la myogénèse.....	56
<b>Figure 15:</b> Myogénèse chez les souris sauvages, déficientes en MyoD ou déficientes en Myf5.....	59
<b>Figure 16:</b> Processus de la régénération musculaire: rôle des cellules satellites.....	61
<b>Figure 17:</b> Localisation des cellules satellites.....	62
<b>Figure 18:</b> Expression des MRF au cours de l'activation des cellules satellites.....	65
<b>Table 1:</b> Expression des MRF au cours de l'hypertrophie musculaire induite par une activité musculaire accrue.....	68
<b>Figure 19:</b> Localisation de l'expression de MyoD dans un muscle squelettique de rat 3 jours après dénervation.....	69
<b>Figure 20:</b> Les différents types de fibres musculaires et quelques méthodes pour les identifier.....	71
<b>Figure 21:</b> Répartition de l'expression de MyoD et de la myogénine en fonction du type de muscle squelettique.....	72



<b>Figure 22:</b> Transition du phénotype musculaire.....	73
<b>Figure 23:</b> Régulation du phénotype musculaire en réponse au calcium.....	75
<b>Figure 24:</b> Implication de la voie PI3Kinase-AKT dans la régulation de la masse musculaire.....	77
<b>Figure 25:</b> Arbres phylogénétiques des protéines de la famille bHLH-O.....	80
<b>Figure 26 :</b> Homologie entre les facteurs BHLHB2 et BHLHB3.....	81
<b>Figure 27:</b> Structure protéique schématique des protéines de la famille bHLH-O.....	82
<b>Figure 28:</b> Mécanismes de répression transcriptionnelle par BHLHB2 et BHLHB3.....	87
<b>Figure 29:</b> Représentation schématique du promoteur de <i>BHLHB2</i> et <i>BHLHB3</i> .....	89
<b>Figure 30 :</b> Autorégulation et régulation réciproque de l'expression de BHLHB2 et BHLHB3.....	90
<b>Table 2 :</b> Implications de BHLHB2 et BHLHB3 dans diverses fonctions physiologiques.....	92
<b>Figure 31 :</b> Effet de BHLHB2 sur la différenciation cellulaire.....	94
<b>Figure 32:</b> Inhibition de la différenciation Myogénique par BHLHB3.....	99
<b>Figure 33 :</b> Répression de l'activité transcriptionnelle de MyoD par BHLHB3.....	101
<b>Figure 34 :</b> Régénération musculaire après lésion chez les souris déficientes en BHLHB2.....	103
<b>Figure 35 :</b> Inhibition de la voie Notch par BHLHB2.....	105
<b>Figure 36 :</b> Activation de l'expression de BHLHB2 par l'insuline.....	107
<b>Figure 37:</b> Voie de signalisation de l'AMPKinase.....	108
<b>Table 3 :</b> Sites consensus de liaison à l'ADN des facteurs de transcription SREBP.....	111
<b>Figure 38:</b> Représentation schématique de la structure des protéines SREBP et de leur homologie.....	112
<b>Figure 39 :</b> Représentation schématique de l'épissage alternatif conduisant à l'expression des deux isoformes de SREBP-1 et leur répartition tissulaire.....	114
<b>Figure 40:</b> Processus de maturation de SREBP et régulation par les stéroïdes.....	119
<b>Figure 41:</b> Gènes et voies métaboliques régulés par les facteurs SREBP.....	120
<b>Table 4 :</b> Altérations du métabolisme lipidique dans différents modèles de souris génétiquement modifiées pour SREBP.....	121
<b>Figure 42:</b> Régulation de l'activité transcriptionnelle de SREBP-1.....	125
<b>Figure 43 :</b> Régulation de l'expression et l'activité transcriptionnelle de SREBP-1 en réponse aux variations nutritionnelles.....	129

<b>Figure 44:</b> Mécanisme de régulation de l'expression de SREBP-1 en réponse aux variations nutritionnelles.....	133
<b>Figure 45:</b> Régulation de l'expression de SREBP-1c par le glucose.....	137
<b>Figure 46 :</b> Action de l'insuline sur le muscle squelettique.....	139
<b>Figure 47 :</b> Régulation de l'expression de SREBP-1 par l'insuline.....	141
<b>Figure 48:</b> Origine de l'insulino-résistance musculaire et hépatique.....	145
<b>Figure 49 :</b> Signalisation de l'insuline.....	147
<b>Figure 50:</b> Expression musculaire de SREBP-1c chez les sujets insulino-résistants.....	150
<b>Figure 51:</b> Effet de l'exercice sur l'expression de SREBP-1.....	152
<b>Figure 52 :</b> Protocole d'isolement des cellules musculaires à partir de biopsie.....	162
<b>Figure 53:</b> Purification des cellules musculaires humaines.....	164
<b>Figure 54:</b> Structure et mécanisme de réplication d'un adénovirus.....	168
<b>Figure 55 :</b> Principe de l'analyse des variations d'expression génique par puces à ADN.....	180
<b>Figure 56:</b> Mécanisme d'inhibition de la différenciation myogénique et de la protéosynthèse musculaire par SREBP-1.....	240



**INTRODUCTION**  
**BIBLIOGRAPHIQUE**



## INTRODUCTION GENERALE

Les muscles striés squelettiques représentent environ 40 % de la masse corporelle d'un individu sain. Le maintien d'une masse musculaire adéquate est critique pour la survie de l'individu, le muscle remplissant des fonctions vitales : la locomotion, la respiration, la thermogénèse, la régulation du métabolisme des lipides et glucides. Ainsi, la masse musculaire évolue en fonction de l'activité physique, augmentant lorsque les muscles sont fortement sollicités et diminuant lors d'un repos prolongé, et en fonction de l'état de santé du sujet, certaines pathologies entraînant une fonte musculaire.

Le muscle squelettique est un organe doté d'une grande plasticité lui permettant de s'adapter aux changements physiologiques ou environnementaux, telles que la croissance, la stimulation mécanique, l'alimentation, l'âge, la maladie. La plasticité musculaire repose sur plusieurs mécanismes.

D'abord, la régulation de la taille des fibres musculaires résulte de la balance entre synthèse et dégradation des protéines musculaires. L'augmentation de la synthèse protéique conduit à l'hypertrophie musculaire, observée lors de la croissance ou à l'âge adulte, lors d'une activité musculaire soutenue. Alors que l'atrophie musculaire, observée lors du vieillissement ou dans certaines situations pathologiques, résulte d'une dégradation protéique accrue.

Le muscle squelettique est un assemblage hétérogène de fibres musculaires possédant des capacités contractiles et métaboliques différentes, des fibres les plus rapides au métabolisme glycolytique aux fibres les plus lentes au métabolisme oxydatif. Le phénotype des fibres musculaires peut évoluer vers l'un ou l'autre des profils, selon le type d'activité physique ou au cours de certaines pathologies comme le diabète.

Enfin, en cas de blessure, le muscle est capable de se régénérer rapidement. A la base de la régénération musculaire : les cellules satellites, véritables cellules souches musculaires. Elles sont activées lors de la survenue d'une lésion, prolifèrent et fusionnent afin de reconstituer de nouvelles fibres musculaire. Les cellules satellites participent également à l'hypertrophie.

L'adaptation du muscle aux signaux physiologiques et pathologiques résulte de l'intégration de signaux extracellulaires au niveau transcriptionnel. La transduction de ces signaux passe par l'activation de facteurs de transcription conduisant à la modification de

l'expression de gènes contrôlant le phénotype musculaire. La spécification et la différenciation de différents types cellulaires, cardiaque, lymphoïde, neuronale comme musculaire, dépendent de l'activité tissu-spécifique de facteurs de transcription appartenant à la super-famille des protéines bHLH. Quatre facteurs bHLH spécifiques du muscle squelettique ont été décrits ; il s'agit des protéines de la famille MyoD comprenant MyoD lui-même, Myf5, MRF4 et la myogénine. Leur rôle au cours de la myogenèse embryonnaire est bien connu : MyoD et Myf5 sont responsables de la détermination du lignage myogénique alors que MRF4 et la myogénine sont nécessaires à la différenciation et la formation des fibres musculaires. Leur expression persiste dans le muscle squelettique adulte où ils assurent le maintien du phénotype musculaire en régulant l'expression des protéines spécifiques du muscle. De nombreux gènes codant pour les protéines sarcomériques ainsi que pour des enzymes métaboliques contiennent des sites de fixation pour ces facteurs de transcription muscle spécifiques, aussi nommés MRF, pour Muscle Regulatory Factors.

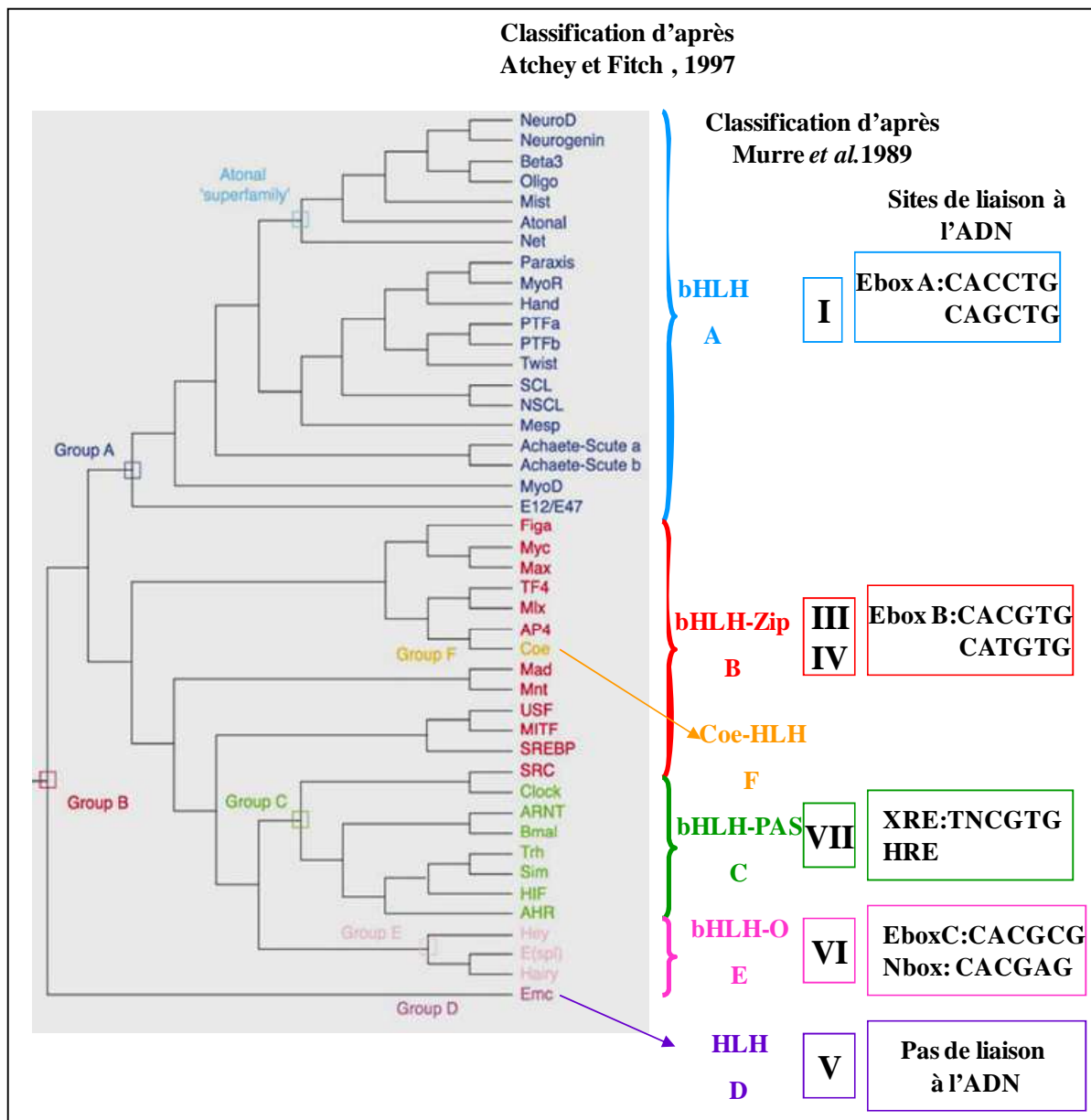
Si les MRF jouent un rôle prépondérant dans le développement et le maintien du phénotype musculaire, la myogenèse fait intervenir bien d'autres facteurs de transcription. Autres facteurs de transcription de la super-famille des bHLH dont le rôle dans la myogenèse commence à être élucidé : les répresseurs transcriptionnels BHLHB2 et BHLHB3. Ils répriment la transcription de leurs gènes cibles en se fixant sur des sites identiques à ceux reconnus par les MRF. L'expression de BHLHB2 et BHLHB3 est très régulée au cours du développement embryonnaire, ces deux facteurs étant impliqués dans de nombreux processus de différenciation cellulaire, tels que la différenciation des trophoblastes, des chondrocytes, des neurones ainsi que la différenciation musculaire. BHLHB2 et BHLHB3 sont capables de réguler la différenciation et la régénération musculaire en inhibant l'expression des MRF.

Outre son rôle dans la motilité, le muscle squelettique joue un rôle central dans le maintien de l'équilibre métabolique de l'organisme. Principal consommateur d'énergie dans l'organisme, c'est aussi un centre de stockage des glucides et des lipides alimentaires ou issus de la synthèse endogène ainsi qu'une source d'acides aminés lors du jeûne. Le métabolisme musculaire doit donc constamment s'adapter à la demande énergétique, notamment en réponse à l'activité physique, et aux variations nutritionnelles. L'altération de ces fonctions de régulation du métabolisme énergétique entraîne d'importants désordres métaboliques à l'origine de pathologies graves, comme le diabète de type 2. Ces adaptations métaboliques du muscle squelettique en réponse aux changements environnementaux sont induites par des

voies de signalisation hormonale, telle que celle de l'insuline, conduisant à l'activation de facteurs de transcription régulant le métabolisme musculaire au niveau transcriptionnel. Un des acteurs majeurs de cette régulation est un autre facteur de la super-famille bHLH : SREBP, Sterol response element binding protein. SREBP-1 a été largement décrit dans le foie et le tissu adipeux comme un régulateur clé du métabolisme des lipides. SREBP-1 est également exprimé dans le muscle squelettique ou quelques études démontrent son rôle dans la régulation du métabolisme lipidique et notamment le stockage de lipides intramusculaires mais également dans le métabolisme du glucose, régulant l'expression d'enzymes clé de la glycolyse. A ce jour aucune fonction spécifique de ce facteur de transcription n'est connue dans le muscle squelettique, pourtant son expression répond aux variations nutritionnelles (insuline) et à l'activité musculaire (exercice, sédentarité).

Le travail de thèse présenté ici s'intéresse particulièrement au rôle, encore très peu décrit, des facteurs SREBP-1 dans le muscle squelettique, en tentant d'élucider ses interactions avec les facteurs de transcription impliqués dans la fonction musculaire, notamment les MRF et les répresseurs transcriptionnels BHLHB2 et BHLHB3.





**Figure 1:** Arbre phylogénétique des différentes familles des facteurs bHLH

d'après Ledent *et al.*, 2002

## ETAT DE LA LITTERATURE

Le terme bHLH fait référence à la structure protéique secondaire commune à tous les membres de cette super-famille de régulateurs transcriptionnels. Cette structure est organisée en deux domaines très conservés représentant environ 60 acides aminés. A l'extrémité carboxy-terminale se situe le motif hélice-boucle-hélice ou Helix-Loop-Helix (HLH) constitué de deux longues hélices alpha séparées par une région de différente longueur en forme de boucle (Murre *et al.* 1989a). Ce motif HLH facilite les interactions avec d'autres protéines porteuses du même motif, via l'interaction entre les résidus hydrophobes sur les 2 hélices alpha, afin de former des homo- ou hétéro-dimères. A l'extrémité amino-terminale, se trouve un domaine basique permettant la liaison à l'ADN au niveau de séquences de reconnaissance hexanucléotidiques E-Box : CANNTG (où NN représente n'importe laquelle des bases nucléotidiques). Les deux nucléotides au centre de cet hexamère sont spécifiques aux différentes classes de protéines bHLH (Jones 2004).

A ce jour, 125 facteurs bHLH ont été répertoriés chez l'homme (Ledent *et al.* 2002). Une première classification de ces facteurs, proposée par Murre *et al.*, est basée sur la distribution tissulaire, la spécificité de liaison à l'ADN et le potentiel de dimérisation. Le nombre de bHLH découverts augmentant, une classification basée sur une approche phylogénétique a été décrite par Atchey et Fitch, répartissant les facteurs de transcription bHLH en six groupes de A à F, prenant en compte la séquence E-Box reconnue, et la présence ou non de domaines additionnels (Figure 1) (Atchley and Fitch 1997).

Les domaines les plus couramment associés au motif bHLH sont les domaines PAS, Orange et Leucine-Zipper. Les domaines additionnels des protéines bHLH sont toujours situés en position carboxy-terminale. Le domaine PAS est un domaine de dimérisation protéique ; il doit son nom aux protéines dans lesquelles il a été décrit : PER/ Aryl hydrocarbon receptor translocator ARNT/Single minded SIM. Les bHLH-PAS forment le groupe C. Le domaine Orange est le domaine caractéristique des bHLH-O du groupe E. Il confère à ses protéines leurs propriétés de répresseurs transcriptionnels. Enfin, les bHLH-LZ, majoritairement présents dans le groupe B, possède un domaine Leucine-Zipper contiguë à la deuxième hélice du motif HLH. Ce domaine permet une plus grande spécificité de dimérisation. Ainsi les protéines Myc, Max et Mad forment un réseau de facteurs réprimant

ou activant la transcription de leurs gènes cibles selon la nature de leurs interactions. Ils se lient sur les E-Box de type B : CACGTG (Grandori *et al.* 2000).

La diversité des motifs de liaisons à l'ADN et des dimères formés par les bHLH leur permettent de former de nombreux réseaux de régulation génique. L'étude des fonctions biologiques des facteurs bHLH chez le xénope, la drosophile et la souris ont montré leur forte implication dans le développement embryonnaire, plus précisément dans la détermination et la différenciation cellulaire et dans la différenciation sexuelle. Chez la levure, les bHLH régulent plusieurs voies métaboliques essentielles, tels que le métabolisme du phosphate et la synthèse des phospholipides (Massari and Murre 2000).

Au regard de leur fonction biologique, les bHLH se divisent en deux groupes : ceux exprimés de façon ubiquitaires dans l'organisme et ceux exprimés de façon tissu-spécifique.

La famille Myc est une des familles de bHLH dont l'expression est ubiquitaire. Les protéines Myc contrôlent l'initiation de la traduction tandis que le réseau Myc-Max-Mad régule de nombreux gènes impliqués dans le cycle cellulaire (Grandori *et al.* 2000).

Les facteurs bHLH, dont l'expression est tissu-spécifique, sont impliqués dans la détermination et la différenciation cellulaire et participent à de nombreux processus au cours du développement. (Massari and Murre 2000; Jones 2004). Ainsi les facteurs de la famille MyoD, Myogenic differentiation factor, spécifiquement exprimés dans le muscle squelettique, régulent la myogenèse embryonnaire.

## **1. Les MRF, facteurs bHLH dans le muscle squelettique**

### **1.1. Les MRF, régulateurs de la myogenèse**

La musculature squelettique des vertébrés supérieurs est une organisation complexe, composée d'unités fonctionnelles, les muscles squelettiques, dont le développement embryonnaire, la croissance et la régénération à l'âge adulte sont finement régulés au niveau moléculaire. La détermination et la différenciation de nombreux types cellulaires, cardiaque, hématopoïétique, neuronale et musculaires, sont gouvernées par l'activité de facteurs bHLH tissu-spécifiques (Massari and Murre 2000; Jones 2004). Il y a 20 ans, des expériences ont été menées afin d'isoler un facteur exprimé spécifiquement dans les myoblastes et induisant la conversion myogéniques de fibroblastes. Ces travaux ont ainsi conduit à l'identification d'un

ADNc, celui du facteur bHLH MyoD, capable de convertir des types cellulaires aussi divers que des fibroblastes, des chondrocytes, des neuroblastes, en myoblastes (Lassar *et al.* 1986; Davis *et al.* 1987; Tapscott *et al.* 1988; Weintraub *et al.* 1989; Choi *et al.* 1990).

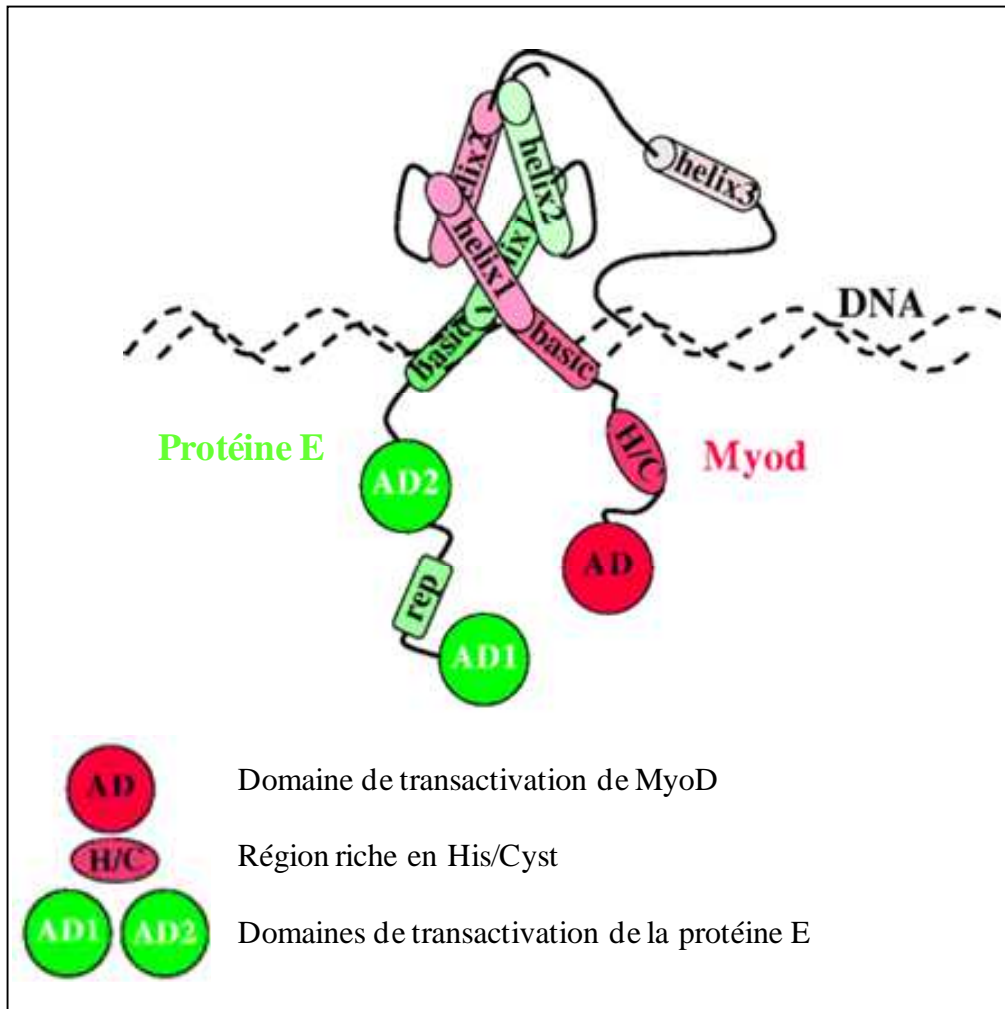
Dans la foulée de la découverte de MyoD, trois autres gènes, partageant une forte homologie avec MyoD, sont découverts : Myf5, myogénine, et MRF4/Myf6/Herculin (Braun *et al.* 1989; Edmondson and Olson 1989; Rhodes and Konieczny 1989; Braun *et al.* 1990; Miner and Wold 1990). Ces quatre protéines appartiennent à la superfamille des bHLH et forment la famille MyoD ou MRF pour Myogenic Regulatory Factors. La surexpression de l'un des quatre MRF dans un type cellulaire non-musculaire peut activer le programme complet de la myogenèse et induire la différenciation musculaire. Les MRF sont donc responsables de la mise en place de l'identité myoblastique et du contrôle de la différenciation terminale (Buckingham 1992).

### **1.1.1. Les propriétés structurales des MRF**

Les MRF appartiennent à la classe II, tissu-spécifique, selon Murre *et al.*, et au groupe A, non porteur de domaine additionnel, selon la classification de Atchey et Fitch, de la superfamille des bHLH. Ces quatre protéines sont homologues à 80% sur leur région bHLH. Elles partagent également une forte identité en dehors du domaine bHLH, sur une région riche en histidine et cystéine adjacente au domaine basique et sur une région riche en sérine et thréonine à leur extrémité C-terminale (Olson 1990; Weintraub *et al.* 1991; Massari and Murre 2000). La structure protéique tertiaire de MyoD est typique de nombreux bHLH, comprenant deux longues hélices  $\alpha$  reliées par une courte boucle de 8 acides aminés. La première hélice inclue le domaine basique, qui se lie à l'ADN en se logeant au niveau du grand sillon de la double hélice. MyoD est un homodimère, dont les deux monomères se lient de façon identique à l'ADN (Ma *et al.* 1994).

Le domaine HLH des MRF leur permet de former soit des homodimères, soit des hétérodimères avec les protéines bHLH de classe I. Les protéines bHLH de classe I incluent les protéines E : HEB/HTF4, E2-2/ITF2 et E2-5/E12/E47, et sont exprimées dans différents tissus et à différentes phases du développement. *In vitro*, les MRF sont capables de former des dimères avec n'importe laquelle des protéines E (Figure 2). Cependant, *in vivo*, les MRF ne se

lient à l'ADN que sous forme d'hétérodimères avec les protéines E12, E47 et HEB (Murre *et al.* 1989b; Lassar *et al.* 1991; Hu *et al.* 1992; Mitsui *et al.* 1993; Shirakata *et al.* 1993).



**Figure 2:** Structure de l'homodimère formé par MyoD et une protéine E

d'après Tapscott, 2005

Les MRF activent la transcription de leur gènes cibles en se liant à leur promoteur au niveau de motifs E-Box consensus, CANNTG (Lassar *et al.* 1989a; Weintraub 1993). Ces gènes cibles des MRF contiennent une ou plusieurs E-Box, reconnues en théorie par tous les facteurs de la superfamille des bHLH. Or, seuls les MRF sont capables d'activer le programme myogénique en induisant l'expression de ces gènes muscle-spécifiques. Comment cette spécificité des MRF vis-à-vis de leurs gènes cibles s'établit-elle ? C'est la question à laquelle quelques études ont tenté de répondre en se concentrant sur les propriétés structurales des MRF.

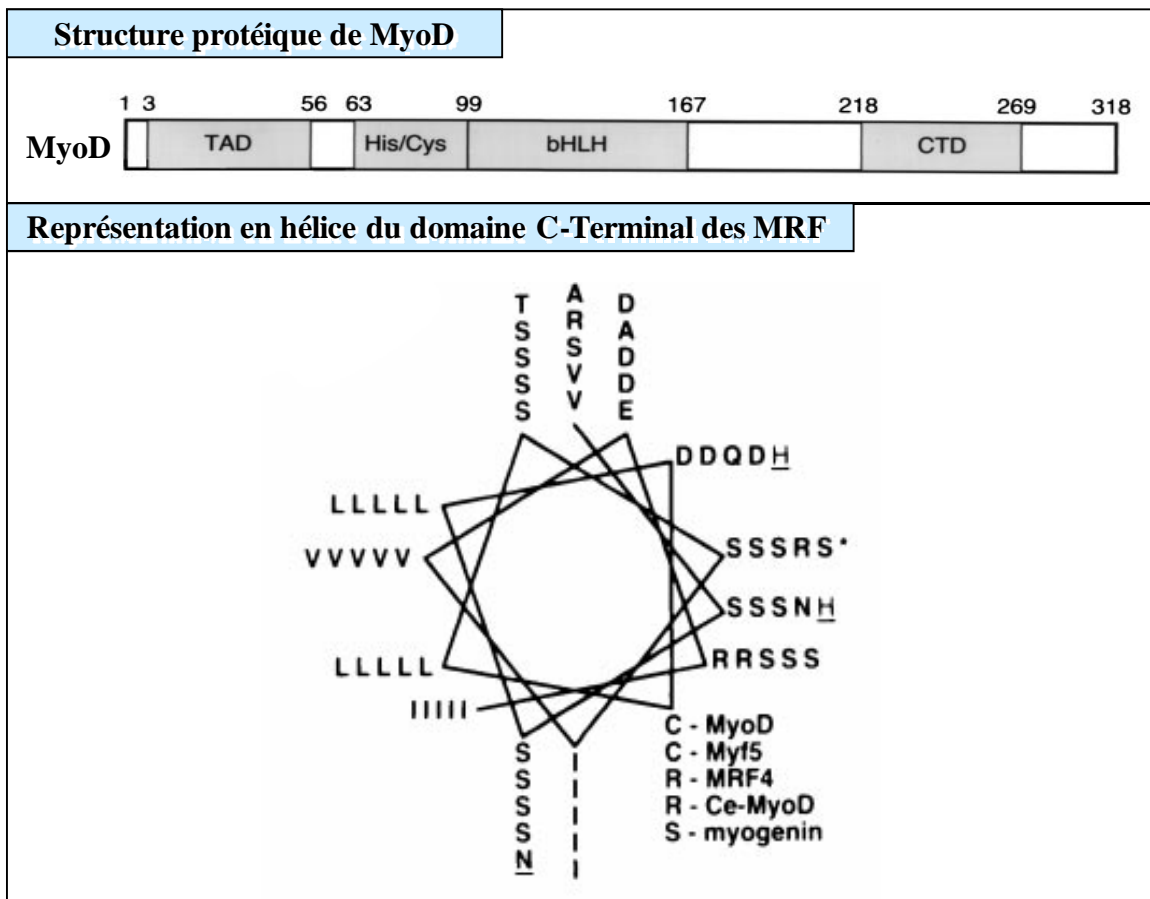
Un début d'explication réside dans la séquence même des motifs E-box reconnus par les MRF. *In vitro* MyoD se lie préférentiellement aux E-Box de motif CAGCTG, alors que la protéine E-47 se lie plutôt aux motifs CACCTG et la protéine Myc, bHLH-LZ du groupe B, aux motifs CACGTG (Blackwell *et al.* 1990; Blackwell and Weintraub 1990; Blackwell *et al.* 1993). Ces trois protéines partagent une grande homologie au niveau de leur domaine bHLH mais participent à des fonctions biologiques différentes. La différence de reconnaissance du motif central des E-box par ces trois protéines pourrait participer à leur spécificité biologique (Puri and Sartorelli 2000). Cependant il existe une importante variation de la séquence centrale des E-box au sein des promoteurs des gènes muscle-spécifiques.

Bien que de séquence similaire, les E-Box mises en évidence au sein des promoteurs des gènes muscle-spécifiques ne sont pas fonctionnellement interchangeables. Le contexte du promoteur dans lequel se trouve chaque E-Box influence l'activité de MyoD (Weintraub *et al.* 1994; Huang *et al.* 1996). L'analyse et la comparaison des structures cristallographiques de MyoD, de E47 (son partenaire) et de Max, une protéine bHLH-LZ du groupe B, ont permis d'apporter une explication à la spécificité d'action de MyoD (Ferre-D'Amare *et al.* 1993; Ellenberger *et al.* 1994; Ma *et al.* 1994). Les données cristallographiques indiquent qu'E-47 et Max se lient aux bases centrales du motif E-Box, via un résidu arginine, alors que MyoD ne se lie pas directement aux bases centrales du motif E-Box mais reconnaît les résidus adjacents en 5' de l'E-Box. Ainsi, la spécificité d'un gène pour MyoD pourrait résider non directement au sein du motif E-Box mais au sein de la séquence nucléique attenante au motif E-Box.

Si les quatre MRF sont capables de se lier à l'ADN au niveau de motifs E-Box, leurs capacités à induire l'activité promotrice de gènes spécifiques du muscle ne sont pas équivalentes. MyoD, par exemple, active efficacement le promoteur des gènes de la M-créatine kinase, de la troponine I, de l' $\alpha$ -actine et de la sous-unité  $\alpha$  du récepteur à l'acétylcholine alors que MRF4 active uniquement les promoteurs des gènes de l' $\alpha$ -actine et de la sous-unité  $\alpha$  du récepteur à l'acétylcholine (Mak *et al.* 1992). Cette spécificité d'activité pourrait s'expliquer par des domaines d'activation transcriptionnelle différents au sein des MRF. MyoD et MRF4 possèdent un domaine d'activation transcriptionnelle unique en position amino-terminale, alors que Myf5 et la myogénine contiennent deux domaines d'activation transcriptionnelle en position amino- et carboxy-terminale. De plus, la séquence de ces domaines diffère d'un MRF à l'autre. La construction de protéines chimériques entre

MyoD et MRF4 ou Myf5 et la myogénine révèle que la spécificité transcriptionnelle de chaque facteur est en partie due à leur domaine d'activation transcriptionnelle (Chakraborty *et al.* 1991; Mak *et al.* 1992; Ludolph and Konieczny 1995).

Par ailleurs, MyoD et Myf5 semblent induire plus efficacement que la myogénine l'initiation de la transcription des gènes muscle-spécifiques, telles que les protéines sarcomériques (Gerber *et al.* 1997). Tous les MRF possèdent un motif protéique C-terminale très conservé. Cette région carboxy-terminale est capable de former une hélice amphipatique  $\alpha$ . Le domaine HLH des MRF étant formé de deux hélices  $\alpha$ , cette structure C-terminale est dénommée hélice III (Figure 3) (Bergstrom and Tapscott 2001).



**Figure 3:** Représentation de l'Hélice III, domaine C-terminal spécifique des MRF  
d'après Bergstrom et Tapscott, 2001

L'hélice III, bien que de structure similaire, semble remplir une fonction différente au sein de MyoD et de la myogénine. Ainsi, lors d'expériences de transfections cellulaires, l'hélice III de la myogénine fonctionne comme un domaine d'activation transcriptionnelle classique mais est incapable d'induire l'expression de gènes muscle-spécifiques s'ils sont silencieux, tandis que l'hélice III de MyoD lui permet d'initier la transcription des gènes muscle-spécifiques mais possède une capacité d'activation transcriptionnelle faible. Cette région fonctionne donc comme un domaine de détermination myogénique au sein de MyoD, nécessaire à l'activation des gènes muscle-spécifiques, alors qu'elle agit comme un domaine de transactivation classique au sein de la myogénine.

L'alignement des séquences protéiques de différents facteurs bHLH connus montre que le domaine bHLH est un motif protéique conservé dans l'ensemble de la superfamille des facteurs bHLH. Cependant, au sein du domaine basique, les MRF comportent trois acides aminés conservés qui ne sont pas présents sur les autres bHLH (Davis and Weintraub 1992). Ces trois acides aminés, arginine, thréonine et lysine, font partie d'un segment de 12 acides aminés du domaine basique des MRF nécessaire et suffisant à la liaison à l'ADN et à l'activation des gènes muscle-spécifiques (Figure 4).

Huit de ces douze résidus sont conservés dans les protéines E, qui n'ont pas de fonction muscle spécifique. Parmi les résidus non-conservés, l'arginine, la thréonine et la lysine au centre du domaine de liaison à l'ADN sont nécessaires à l'activation transcriptionnelle mais pas à la liaison à l'ADN en elle-même (Davis *et al.* 1990; Brennan *et al.* 1991). Pour MyoD, ces résidus correspondent à l'arginine A114, la thréonine T115 et la lysine K124. La mutation de ces acides aminés n'empêche pas la liaison à l'ADN de MyoD mais bloque sa capacité d'activation transcriptionnelle. Inversement, lorsque ces trois acides aminés sont « greffés » sur la protéine E12, ils lui confèrent la propriété de convertir des fibroblastes en myoblastes (Davis *et al.* 1990; Davis and Weintraub 1992). Ces trois acides aminés sont donc cruciaux pour l'activité myogénique des MRF. Ils sont conservés au sein des MRF au cours de l'évolution puisqu'on les retrouve aussi bien chez l'oursin, la drosophile que chez les mammifères. Ils pourraient constituer une sorte de code myogénique au cours de l'évolution (Michelson *et al.* 1990; Braun and Arnold 1991; Paterson *et al.* 1991; Venuti *et al.* 1993).



Alignement des séquences protéiques des MRF et autres facteurs bHLH												
Myogénine	R	R	R	A	A	T	L	R	E	K	R	R
MyoD	R	R	K	A	A	T	M	R	E	R	R	R
Myf5	R	R	K	A	A	T	M	R	E	R	R	R
MRF4	R	R	K	A	A	T	L	R	E	R	R	R
E12	R	R	V	A	N	N	A	R	E	R	L	R
E47	R	R	M	A	N	N	A	R	E	R	V	R
c-myc	K	R	R	T	H	N	V	L	E	R	Q	R
USF	R	R	A	Q	H	N	E	V	E	R	R	R

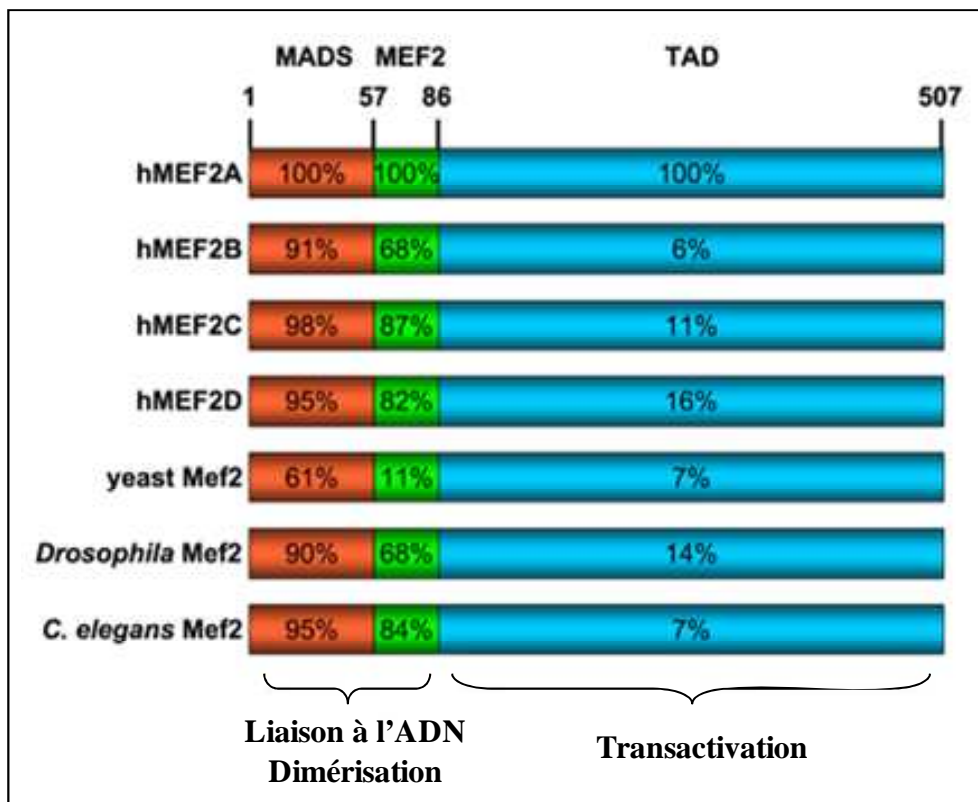
Position des acides aminés Ala114, Thr115 et Lys124 de MyoD lors de sa liaison à l'ADN											

**Figure 4:** Mise en évidence du « code myogénique » des MRF  
d'après Puri et Sartorelli, 2000

La structure cristallographique de MyoD lié à l'ADN montre que la lysine K124 est exposée en surface du complexe MyoD/ADN et pourrait donc participer à une interaction avec un autre facteur (Figure 4). Cependant, l'analyse mutationnelle indique que la lysine K124 n'est pas nécessaire à l'activité myogénique (Davis and Weintraub 1992). Ce sont donc les acides aminés A114 et T115 qui confèrent à MyoD ses propriétés myogéniques. Lorsque MyoD est lié à l'ADN, ces deux acides aminés sont cachés au sein du grand sillon de la double hélice d'ADN et inaccessibles à toutes interactions protéiques directes (Ma *et al.* 1994). Ils pourraient donc jouer un rôle indirect dans la spécificité musculaire de MyoD en modifiant sa conformation afin d'optimiser sa liaison avec l'ADN et de permettre le recrutement d'un éventuel co-régulateur muscle-spécifique (Weintraub *et al.* 1991). Les protéines de la famille MEF2 semblent être ces co-régulateurs interagissant avec les MRF afin d'activer le programme myogénique (Puri and Sartorelli 2000).

### 1.1.2. Interaction entre les MRF et les protéines MEF2

Une seconde classe de facteurs de transcription musculaires contrôle le programme myogénique ; il s'agit des protéines MEF2, myocyte enhancer factor-2, appartenant à la superfamille des protéines MADS. Ce nom provient des quatre premières protéines identifiées appartenant à cette famille : MCM1 chez la levure, Agamous et Deficiens chez les végétaux et Serum response factor chez les vertébrés. Les membres de la famille MADS partagent un motif commun de 56 acides aminés, appelé MADS box. Ce domaine permet la liaison à l'ADN et la dimérisation des facteurs MADS entre eux. En outre, les protéines MEF2 possèdent, immédiatement à l'extrémité C-terminale de la MADS box, un motif unique de 29 acides aminés conservés, le domaine MEF2, responsable de la spécificité de reconnaissance des protéines Mef2 vis-à-vis de leurs gènes cibles (Figure 5) (Shore and Sharrocks 1995; Messenguy and Dubois 2003; Potthoff and Olson 2007).



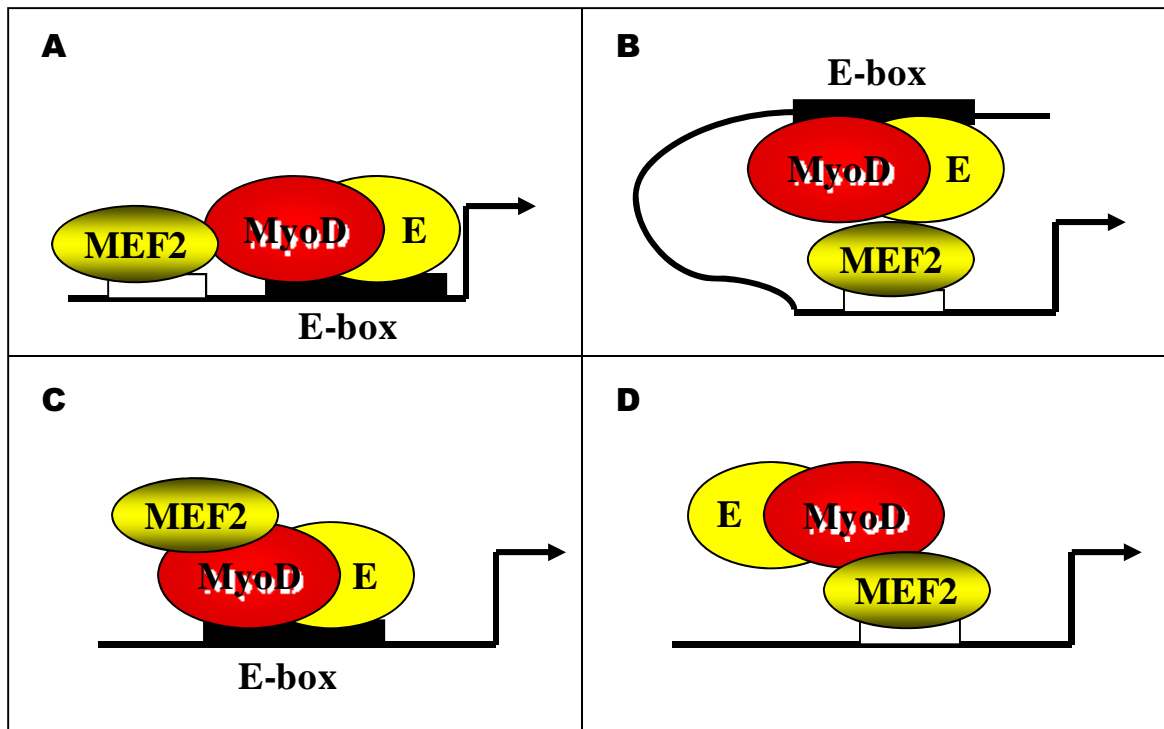
**Figure 5:** Structure protéique des membres de la famille MEF2 et leur homologie dans plusieurs organismes

d'après Potthoff et Olson, 2007

Chez les vertébrés, la famille MEF2 comprend quatre gènes distincts : MEF2A, MEF2B, MEF2C, MEF2D (Figure 5). L'expression des protéines MEF2 dans de nombreux types cellulaires, dont les neurones, les chondrocytes et les cellules musculaires, lisses, cardiaques et squelettiques se produit en même temps que l'activation de leur programme de différenciation (Olson *et al.* 1995; Arnold *et al.* 2007; Potthoff and Olson 2007).

MEF2 a d'abord été identifié comme un facteur se liant à l'ADN de manière spécifiquement musculaire, au niveau d'un motif A/T riche : -CTA[A/T]<sub>4</sub>TAG/A sur le promoteur du gène de la créatine kinase. Tous les facteurs MEF2 identifiés depuis ont la capacité de se lier à ce site MEF2 consensus (Gossett *et al.* 1989). Par la suite, des sites MEF2 ont été identifiés au niveau des régions promotrices de la plupart des gènes spécifiquement musculaires (Olson *et al.* 1995; Wang *et al.* 1995a; Wang *et al.* 1996a).

L'analyse des régions promotrices de nombreux gènes muscle-spécifiques montre que les MRF agissent en étroite coopération avec les protéines MEF2 afin d'activer la transcription dans les cellules musculaires squelettiques (Figure 6). Un exemple flagrant de cette coopération entre MRF et MEF2 est la régulation du promoteur du gène codant pour la desmine, protéine musculaire sarcomérique. L'expression de ce gène est contrôlée par une région régulatrice distale comprenant un site MEF2 et une E-Box adjacente (Figure 6A et B). Des expériences de mutagenèse dirigée montrent que ces deux sites sont nécessaires à l'activité transcriptionnelle de ce promoteur (Li and Capetanaki 1994) ainsi qu'à l'activation de l'expression de la desmine au cours du développement musculaire (Kuisk *et al.* 1996). Un site MEF2 et une E-Box sont également présents sur le promoteur de *MRF4* et activent synergiquement la transcription de *MRF4* en présence de MEF2, de MyoD ou de la myogénine (Black *et al.* 1995; Naidu *et al.* 1995). MEF2 et MyoD activent également de manière synergique les gènes codant la créatine kinase, des chaînes légères de la myosine 1 et 3, et la myogénine (Kaushal *et al.* 1994). De façon intéressante, la mutation d'un des deux motifs MEF2 ou E-box sur le promoteur du gène de la desmine ou de *MRF4* n'abolit pas l'action synergique des MRF et de MEF2 sur leur transcription. Les MRF et MEF2 peuvent donc interagir même si seul un site de liaison pour l'un des deux facteurs est présent sur le promoteur du gène cible (Figure 6 C et D). Ainsi, certains gènes ne possèdent pas de E-Box au sein de leur promoteur mais peuvent être induit par les MRF (Thompson *et al.* 1991; Navankasattusas *et al.* 1992; Parmacek *et al.* 1994).



**Figure 6: Différents mécanismes d'activation transcriptionnelle par MEF2 et MyoD**  
d'après Molkenin et Olson, 1996

La transactivation du promoteur du gène de la myogénine par MyoD et la myogénine elle-même, par exemple, nécessite un site MEF2 mais pas de E-Box (Edmondson *et al.* 1992; Buchberger *et al.* 1994; Parmacek *et al.* 1994). Le gène de la protéine sarcomérique troponine C, dont l'expression est activée par la myogénine et MyoD, ne contient qu'un site MEF2 (Parmacek *et al.*, 1994). Dans ces cas, la mutation du site MEF2 supprime totalement l'activation transcriptionnelle par les MRF, suggérant que les MRF sont capables d'agir indirectement sur le promoteur de ces gènes via un site MEF2. Une étude montre que la myogénine et MEF2, provenant d'extrait nucléaire de myotubes, se lient l'ADN de façon coordonnée (Funk and Wright 1992).

La démonstration de l'interaction entre MEF2 et les MRF est apportée par une étude de Molkenin *et al.* (1996), montrant que MEF2, à l'inverse des MRF, ne possède d'activité myogénique intrinsèque mais est capable d'induire la conversion myogénique de fibroblastes en culture en synergie avec les MRF. Cette synergie est la résultante d'une interaction protéine-protéine directe entre les facteurs MEF2 et les hétérodimères MRF-protéines E. Des expériences d'immuno-précipitation montrent que MEF2C peut se lier à l'hétérodimère formé par la myogénine et la protéine E-12 (Molkenin *et al.* 1995). Par contre, MEF2C est

incapable de reconnaître l'un de ces deux facteurs isolés. La formation du complexe MRF-protéines E permet donc la formation d'une surface de reconnaissance et d'interaction avec MEF2. Cette interaction se réalise entre l'extrémité amino-terminale de MEF2C regroupant les domaines MADS box et MEF2 et le domaine bHLH de la myogénine. Cette interaction permet à chaque facteur de reconnaître le site de liaison à l'ADN de l'autre.

La synergie entre MEF2 et MRF dépend de la présence des résidus Alanine et Thréonine conférant leurs propriétés myogéniques aux MRF. En effet, la protéine chimérique MyoD contenant le domaine basique de la protéine E12, ne comprenant pas le « code myogénique », est incapable d'interagir avec MEF2C. Ainsi, ces mêmes résidus prédits pour permettre le recrutement d'un co-régulateur par MyoD, sont nécessaires à l'interaction entre les domaines de liaison à l'ADN de MEF2 et des MRF (Molkentin *et al.* 1995).

D'autre part, les expressions des MRF et de MEF2 sont intimement liées par une régulation réciproque. Ainsi, la surexpression de MyoD ou de la myogénine dans des fibroblastes subissant une conversion myogénique, ainsi que dans des cellules rénales résistantes à la conversion myogénique, induit l'expression de MEF2 (Cserjesi and Olson 1991). L'expression des MEF2 est donc régulée par les MRF. Cependant, le site MEF2 des promoteurs des gènes de la myogénine et de MRF4 chez la souris, du promoteur du gène de MyoD chez le Xenope, sont nécessaires à l'expression de ces MRF dans des cellules musculaires en cultures (Edmondson *et al.* 1992; Buchberger *et al.* 1994; Wong *et al.* 1994; Naidu *et al.* 1995). De façon réciproque, MEF2 régule donc l'expression des MRF. Toutefois, les facteurs MEF2 étant exprimés après les MRF au cours de la différenciation de cellules musculaires, il est plus probable que les facteurs MEF2 jouent un rôle d'amplification et de maintenance de l'expression des MRF au cours de la différenciation, plutôt qu'un rôle d'initiation de leur transcription.

### **1.1.3. Régulations de l'activité des MRF**

#### **a) Régulation par les facteurs de croissance**

L'activation du programme myogénique au cours du développement est sous le contrôle de nombreux facteurs, comme les facteurs de croissance FGF, fibroblasts growth factors, et BMP, Bone Morphogenetic Proteins (Buckingham 2006). *In vitro*, la différenciation de myoblastes est réprimée par de fortes concentrations en sérum. Dans ces conditions, les MRF sont exprimés et transportés dans le noyau mais l'expression de leurs

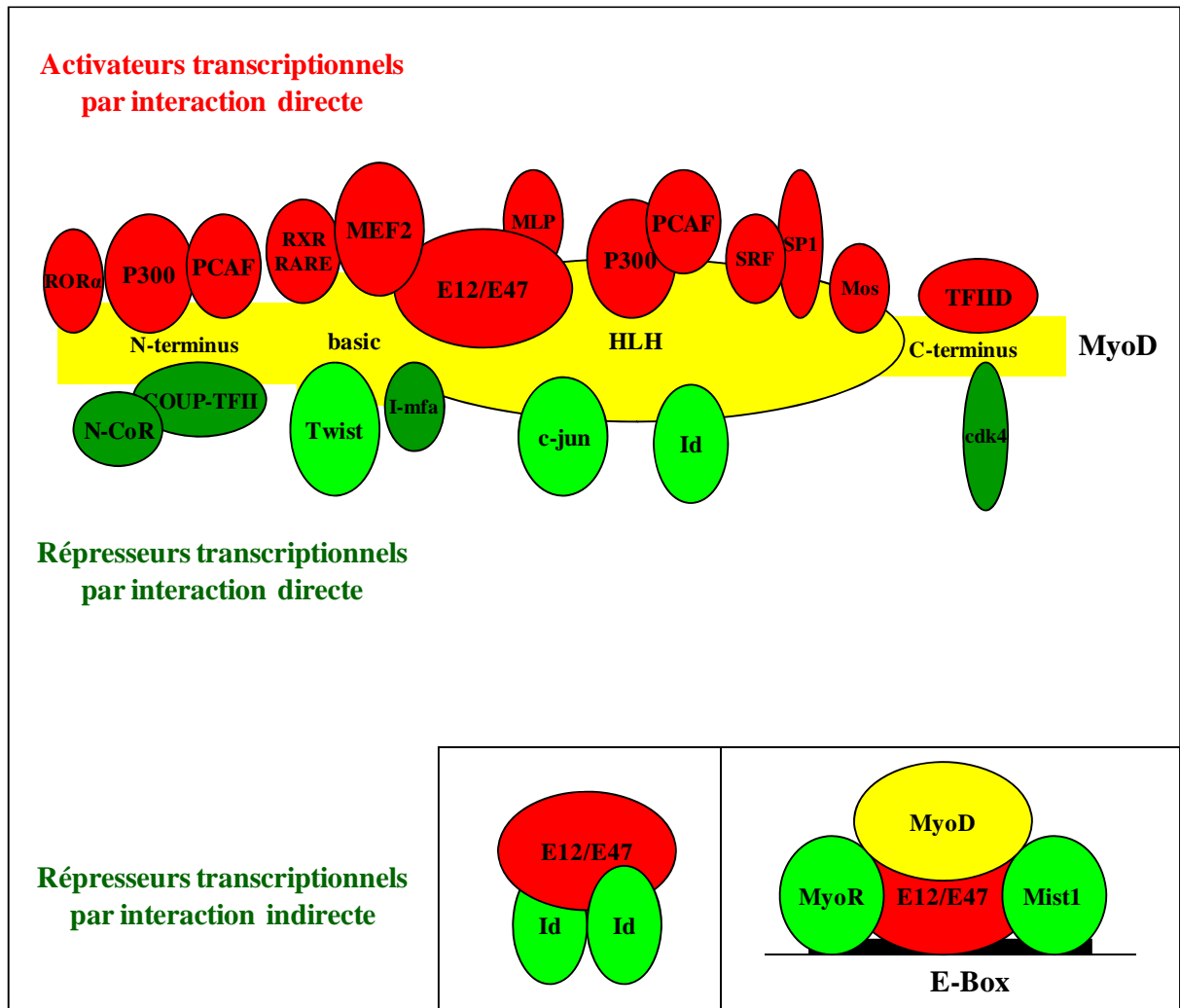
gènes cibles n'est pas activée. L'activité des MRF est donc inhibée lorsque les cellules sont exposées aux facteurs de croissance (Spizz *et al.* 1986). Les deux plus puissants inhibiteurs de la différenciation musculaire sont le FGF et le TGF $\beta$  (Olson *et al.* 1986; Clegg *et al.* 1987). Le TGF $\beta$  inhibe l'activité de la myogénine et de MyoD sans pour autant affecter leur capacité de liaison à l'ADN. Il existe plusieurs mécanismes par lesquels les facteurs de croissance peuvent réprimer l'action des MRF.

Un de ces mécanismes passe par la suppression de la liaison des MRF à leurs partenaires transcriptionnels, les protéines E. Plusieurs protéines peuvent tenir ce rôle d'antagoniste myogénique. La plupart de ces inhibiteurs contiennent également un domaine HLH. Il s'agit, entre autres, des protéines Id, Twist, MyoR et Mist-1 (Figure 7).

Les facteurs Id, codés par quatre gènes différents (Id-1 à -4), sont fortement exprimés dans les cellules, en présence de concentrations élevées en sérum (Jen *et al.* 1992). Cette forte expression d'Id inhibe l'activité des MRF. Id agit en fait comme un dominant négatif, formant des hétérodimères avec les protéines E. De cette façon, séquestrant les protéines E, il empêche leur liaison aux MRF et l'activation des gènes muscle-spécifiques, permettant la différenciation des myoblastes. Id peut également former des hétérodimères directement avec les MRF (Langlands *et al.* 1997). Dans ce cas, Id ne possédant pas de domaine basique de liaison à l'ADN, l'hétérodimère Id/MRF est dépourvu d'activité transcriptionnelle. Une étude vient supporter ce mécanisme d'action en montrant qu'une protéine chimère, au sein de laquelle MyoD et E47 sont contenus dans un même polypeptide, est résistante à l'inhibition par Id (Neuhold and Wold 1993).

Comme Id, Twist, une protéine HLH également, inhibe la différenciation myogénique en séquestrant les protéines E par hétérodimérisation. A l'inverse d'Id, Twist possède un domaine basique. Cependant, ce domaine basique ne lui permet pas de lier l'ADN mais le domaine basique des MRF (Hamamori *et al.* 1997). Il bloque ainsi la liaison des MRF sur les E-Box. Twist peut également inhiber la myogenèse en se liant à MEF2 (Spicer *et al.* 1996).

MyoR et Mist-1 sont également des inhibiteurs de la myogenèse. Ces facteurs contiennent un domaine basique et forment des hétérodimères avec les MRF. Les dimères MRF/MyoR et MRF/Mist-1 peuvent se lier aux E-Box mais sont incapables d'activer la transcription une fois liés à l'ADN (Lemercier *et al.* 1998; Lu *et al.* 1999).



**Figure 7:** Différents activateurs et répresseurs de l'activité transcriptionnelle de MyoD d'après Puri et Sartorelli, 2000

D'autre part, les facteurs de croissance induisent l'expression des gènes dit à réponse précoces. Les gènes à réponse précoce sont les premiers gènes à être transcrits en réponse à un signal extracellulaire. L'expression cellulaire de ces gènes est induite par de fortes concentrations en sérum. Les produits de ces gènes sont les facteurs de transcription c-fos, c-jun et c-myc. Ces facteurs sont des inhibiteurs de la myogenèse (Lassar *et al.* 1989b; Miner and Wold 1991; Li *et al.* 1992a). C-jun, par exemple, interagit directement avec la région bHLH de MyoD et inhiber son activité (Figure 7) (Bengal *et al.* 1992).

Un second niveau de régulation des MRF implique des modifications post-traductionnelles qui peuvent être induites par les facteurs de croissance (Mitsui *et al.* 1993). La liaison des facteurs de croissance à leurs récepteurs membranaires active des voies de

signalisation conduisant à l'activation de nombreuses kinases intracellulaires. La protéine kinase AMP cyclique-dépendant, PKA, et la protéine kinase C, PKC, sont connues pour inhiber l'activité des MRF lorsqu'elles sont exprimées et activées de façon constitutive dans les myocytes (Li *et al.* 1992b). Le mécanisme d'inhibition par la PKA semble être indirect, la mutation de ses sites de phosphorylation sur la myogénine et MRF4 n'ayant aucun effet sur l'inhibition de la différenciation myogénique (Li *et al.* 1992b). Par contre, l'inhibition de la myogénine par PKC implique la phosphorylation directe d'un résidu thréonine situé au sein du domaine basique, empêchant la liaison de la myogénine à l'ADN. Cette phosphorylation peut être induite par le facteur de croissance FGF2 (Li *et al.* 1992c). Ce résidu thréonine est conservé dans tous les MRF ; cependant FGF2 n'induit pas la phosphorylation sur ce résidu ni l'inhibition de la liaison à l'ADN de MyoD et de MRF4 (Hardy *et al.* 1993). L'inhibition de la myogenèse par FGF2 passe donc, en partie, par un mécanisme indépendant de la PKC. Une autre kinase est impliquée dans l'inhibition des MRF. Bennett et ses collaborateurs (1997) montrent que, dans des cellules C2C12, la MAPKinase p42/ERK2 inhibe l'activité des MRF et est inactivée de façon concomitante à l'activation des gènes muscle-spécifiques au cours de la différenciation de ces cellules. La surexpression de la MAPKinase Phosphatase1 inhibe l'activité de la p42/ERK2 et permet l'activation du programme myogénique (Bennett and Tonks 1997).

Si la plupart des kinases inhibent l'activité des MRF, MEF2, quant à lui, est activé par la p38 kinase et la kinase MKK5/MBK1 (Han *et al.* 1997; Kato *et al.* 1997). L'activité de la p38 kinase augmente au cours de la différenciation musculaire et est plus particulièrement requise au cours de la phase terminale de la myogenèse (Zetser *et al.* 1999). L'activité de p38 est en effet nécessaire à l'expression des gènes codant pour les protéines musculaires de structure et les protéines contractiles cruciales pour l'établissement de la morphologie et de la fonction musculaire. La p38 kinase agit, en partie, en phosphorylant le domaine de transactivation de MEF2 (Yang *et al.* 1999; Zhao *et al.* 1999; Cox *et al.* 2003; De Falco *et al.* 2006). *In vivo*, l'activité p38 kinase facilite la liaison de MEF2 et MyoD au promoteur de leurs gènes cibles, puis le recrutement de l'ARN Polymérase II (Penn *et al.* 2004). Cet effet semble impliquer des modifications de la chromatine, soit via le recrutement p38-dépendant du cofacteur SWI/SNF par MyoD, soit via une phosphorylation directe des histones par p38 (Thomson *et al.* 1999; Simone *et al.* 2004).

Ainsi les facteurs de croissance activent des voies de signalisation afin d'inhiber la différenciation et de faciliter la prolifération des myoblastes. La croissance cellulaire est en



effet incompatible avec le processus de différenciation. Il est clairement établi que la présence de sérum dans le milieu de culture de myoblastes, au dessus d'un seuil critique, stimule la progression du cycle cellulaire en phase S et bloque l'engagement dans la différenciation cellulaire. En ce sens, les régulations des MRF et du cycle cellulaire sont étroitement liées (Kitzmann and Fernandez 2001).

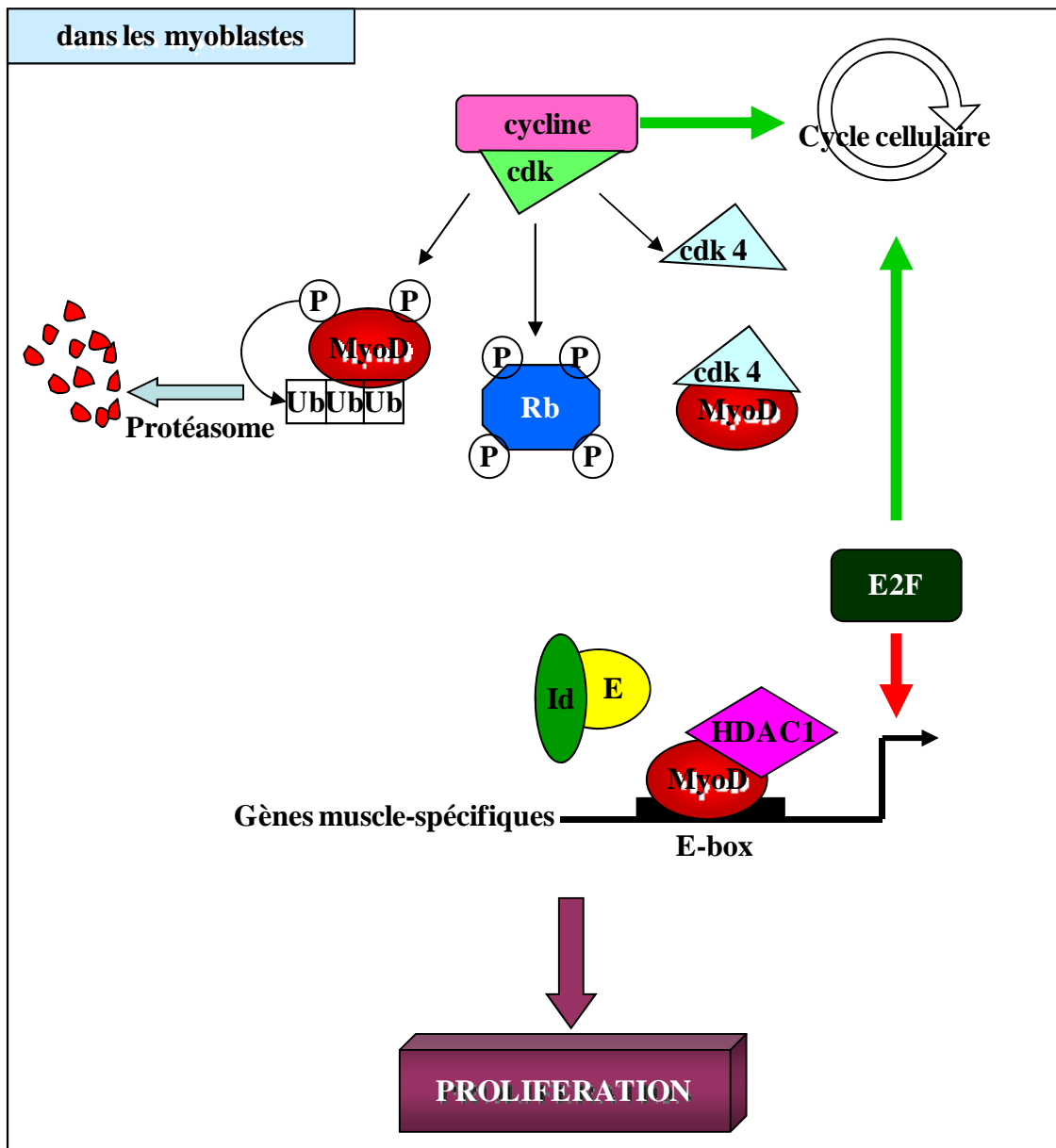
### **b) Régulation des MRF au cours du cycle cellulaire**

L'engagement des cellules myoblastiques dans le processus de différenciation cellulaire nécessite auparavant un arrêt irréversible du cycle cellulaire. Cette étape clé de la différenciation musculaire implique l'inhibition des activateurs du cycle cellulaire, les cyclines et les cyclines-dépendantes kinases cdk, et l'activation des inhibiteurs du cycle cellulaire, les inhibiteurs des cdk, CDKI, p21, p27, et p57 ainsi que la protéine Rb, produit du gène de susceptibilité au rétinoblastome (Figure 8 et 9) (Schneider *et al.* 1994; Guo *et al.* 1995; Halevy *et al.* 1995; De Falco *et al.* 2006)

La synchronisation artificielle du cycle cellulaire de myoblastes a permis de révéler que MyoD et Myf5, eux-mêmes, sont sujets à une régulation spécifique au cours du cycle cellulaire (Kitzmann *et al.* 1998). Ainsi, MyoD présente un pic d'expression au tout début de la phase G1 du cycle cellulaire, puis son expression chute pour atteindre son niveau le plus bas au cours de la transition de la phase G1 à la phase S. Myf5, quant à lui, est absent des cellules en différenciation bloquées en phase G1. Cependant, il reste exprimé dans les cellules quiescentes, en phase G0, alors que ces cellules ne contiennent ni MyoD ni myogénine (Lindon *et al.* 1998; Buckingham 2001; Wei and Paterson 2001).

En plus d'être régulé au niveau transcriptionnel au cours du cycle cellulaire, MyoD est inhibé au niveau post-traductionnel, par les cyclines et les cdk (Figure 8). Ainsi, la surexpression de la cycline D1, régulant la transition entre les phases G1 et S, de cdk4, des complexes cdk2/cycline A et cdk2/cycline E dans des myoblastes en prolifération inhibe l'activité de MyoD et de la myogénine (Rao *et al.* 1994; Skapek *et al.* 1995; Skapek *et al.* 1996; Guo and Walsh 1997). Dans les myoblastes en prolifération, MyoD est phosphorylé sur le résidu sérine Ser200 par cdk1 et cdk2 (Song *et al.* 1998; Kitzmann *et al.* 1999). Cette phosphorylation favorise l'ubiquitination et la dégradation rapide de MyoD au cours de la transition G1-S (Kitzmann 2001, De Falco 2006). La cycline D1 permet l'expression de la

cycline E, et ainsi la formation du complexe cdk2/cycline E, induisant la dégradation de MyoD, mais également l'accumulation nucléaire de cdk4. Cdk4 inhibe l'activité transcriptionnelle de MyoD en se liant à son domaine C-terminale et bloquant ainsi sa liaison à l'ADN (Zhang *et al.* 1999). De plus, le complexe cyclineD1/cdk4 phosphoryle la protéine Rb au cours de la transition G1-S (Figure 8) (Sherr 1995). La protéine Rb bloque le passage des cellules en phase S et doit être inactivée par phosphorylation pour permettre la progression du cycle cellulaire. Rb exerce cette fonction en réprimant activement le facteur de transcription E2F. Celui-ci contrôle l'expression d'une famille de gènes indispensable au passage des cellules en phase S. La phosphorylation de Rb diminue sa capacité à réprimer E2F et permet l'expression des gènes de la phase S (Molkentin and Olson 1996b).



**Figure 8:** Régulation de l'activité transcriptionnelle de MyoD au cours du cycle cellulaire, dans les myoblastes en prolifération

E2F1 est le plus étudié des facteurs E2F au cours de la myogenèse. Son expression est inhibée durant la différenciation musculaire et les myocytes surexprimant E2F1 ne peuvent sortir du cycle cellulaire pour se différencier. De plus, E2F1 inhibe l'activation de la transcription des gènes muscle-spécifiques par la myogénine et MyoD (Figure 8) (Shin *et al.* 1995).

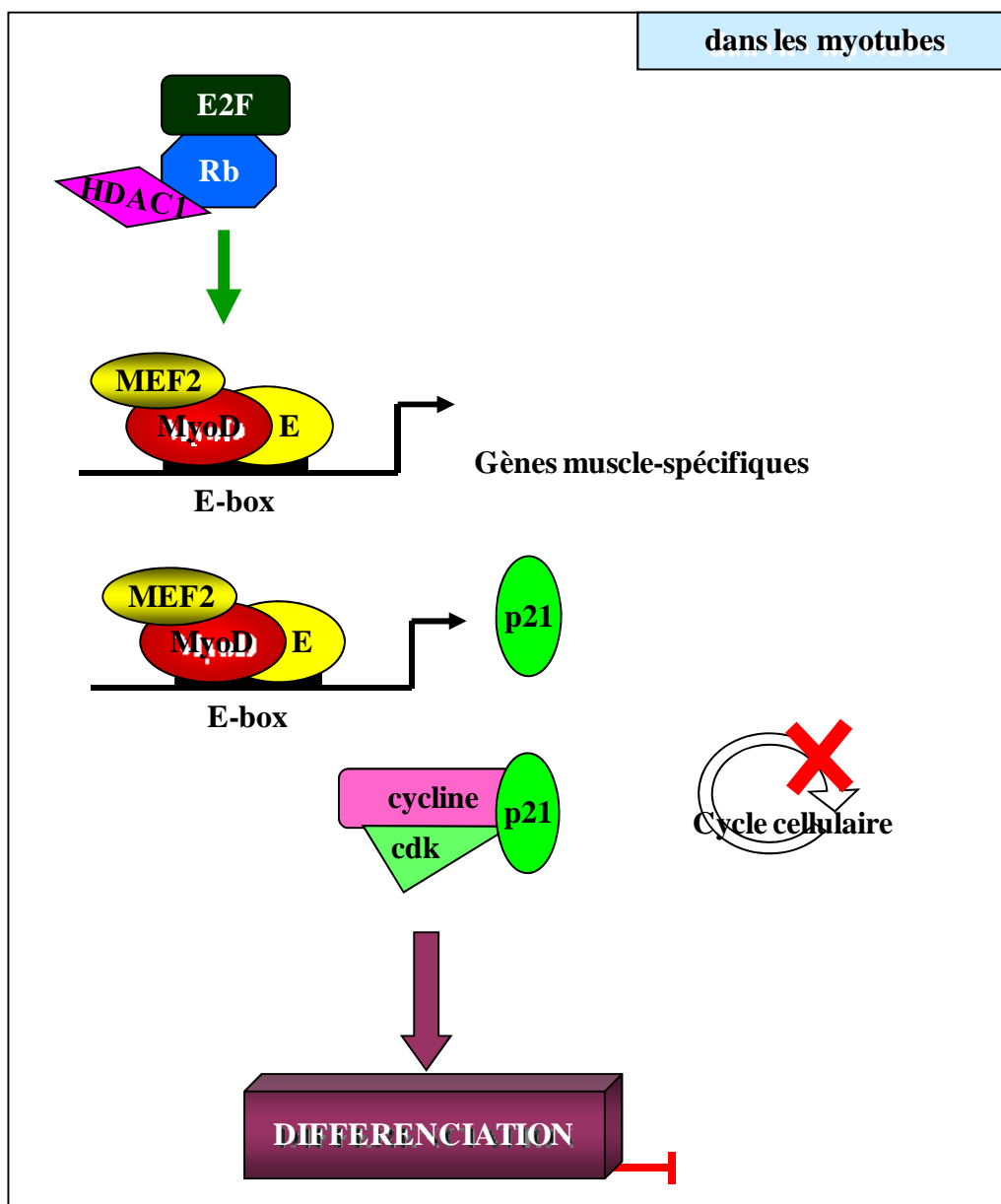
Rb influence l'activation du programme myogénique par d'autres mécanismes que la régulation de l'activité d'E2F. Ainsi, un mécanisme de synergie transcriptionnelle entre Rb et MyoD est reporté par plusieurs études (Gu *et al.* 1993; Novitch *et al.* 1996; Sellers and Kaelin 1996). Rb est en effet capable de stimuler significativement l'activité transcriptionnelle de MyoD et d'induire l'expression de marqueurs tardifs de la différenciation musculaire, les protéines des chaînes lourdes de la myosine, MHC, et la créatine kinase musculaire, MCK (Figure 9) (Gu *et al.* 1993). Ce mécanisme ne passe pas par une interaction directe entre Rb et le domaine bHLH de MyoD, comme le montre des études par résonance magnétique et spectrométrie de masse (Smialowski *et al.* 2005). Cependant, Rb est essentiel à la coopération entre MyoD et MEF2, nécessaire à l'expression des gènes muscle-spécifiques. Ainsi, la différenciation musculaire induite par MyoD et MEF2c est grandement favorisée par la co-expression d'une protéine chimérique Rb-E2F1 (Novitch *et al.* 1999).

Rb coopère également avec la protéine HDAC1, histone déacétylase (Zhang *et al.* 2000). Les histones déacétylases sont recrutées par les facteurs de transcription avec lesquels elles interagissent directement. Elles agissent comme co-répresseurs transcriptionnels en déacétylant la chromatine qui adopte alors une conformation « fermée », non accessible à la machinerie basale de transcription. HDAC1 interagit avec MyoD et inhibe son activité transcriptionnelle. Le retrait du sérum des conditions de culture des myoblastes entraîne l'inhibition des cyclines/cdk et l'activation de Rb, qui n'est plus phosphorylé. Rb peut alors se lier à HDAC1 et rompre sa liaison à MyoD, qui retrouve son activité transcriptionnelle pour induire l'expression des gènes muscle-spécifiques (Figure 9) (Puri *et al.* 2001).

Enfin, l'induction de la myogenèse par MyoD est accompagnée d'une inhibition de l'activité cyclines/cdk et d'une augmentation de l'expression des CDKI, inhibiteurs des cdk et de Rb. L'expression des CDKI, en particulier p21 (Schneider *et al.* 1994; Guo *et al.* 1995; Halevy *et al.*) mais aussi p27 (Zabludoff *et al.* 1998) et p18 (Franklin and Xiong 1996), est stimulée au cours de la myogenèse chez la souris ainsi que dans les précurseurs myogéniques, expliquant l'inhibition concomitante de l'activité des cdk. La surexpression de MyoD induit l'expression du gène codant p21 via une E-Box située sur son promoteur distal (Halevy *et al.*

1995). MyoD en activant l'expression de p21, inhibe l'activité résiduelle des cyclines/cdk et empêche la re-phosphorylation de Rb, l'activation d'E2F ainsi que la progression du cycle cellulaire en phase S (Figure 9).

Par ailleurs, l'expression de Rb est augmentée par MyoD dans des cellules C2 en culture (Martelli *et al.* 1994). En plus de p21 et Rb, MyoD active également l'expression de la cycline D3 (Cenciarelli *et al.* 1999). La cycline D3 est la seule cycline dont l'expression augmente au cours de la différenciation ; elle contribue à la sortie des myoblastes du cycle cellulaire (Kiess *et al.* 1995).



**Figure 9:** Régulation du cycle cellulaire par MyoD dans les myotubes en différenciation

d'après Sabourin et Rudkini, 2000

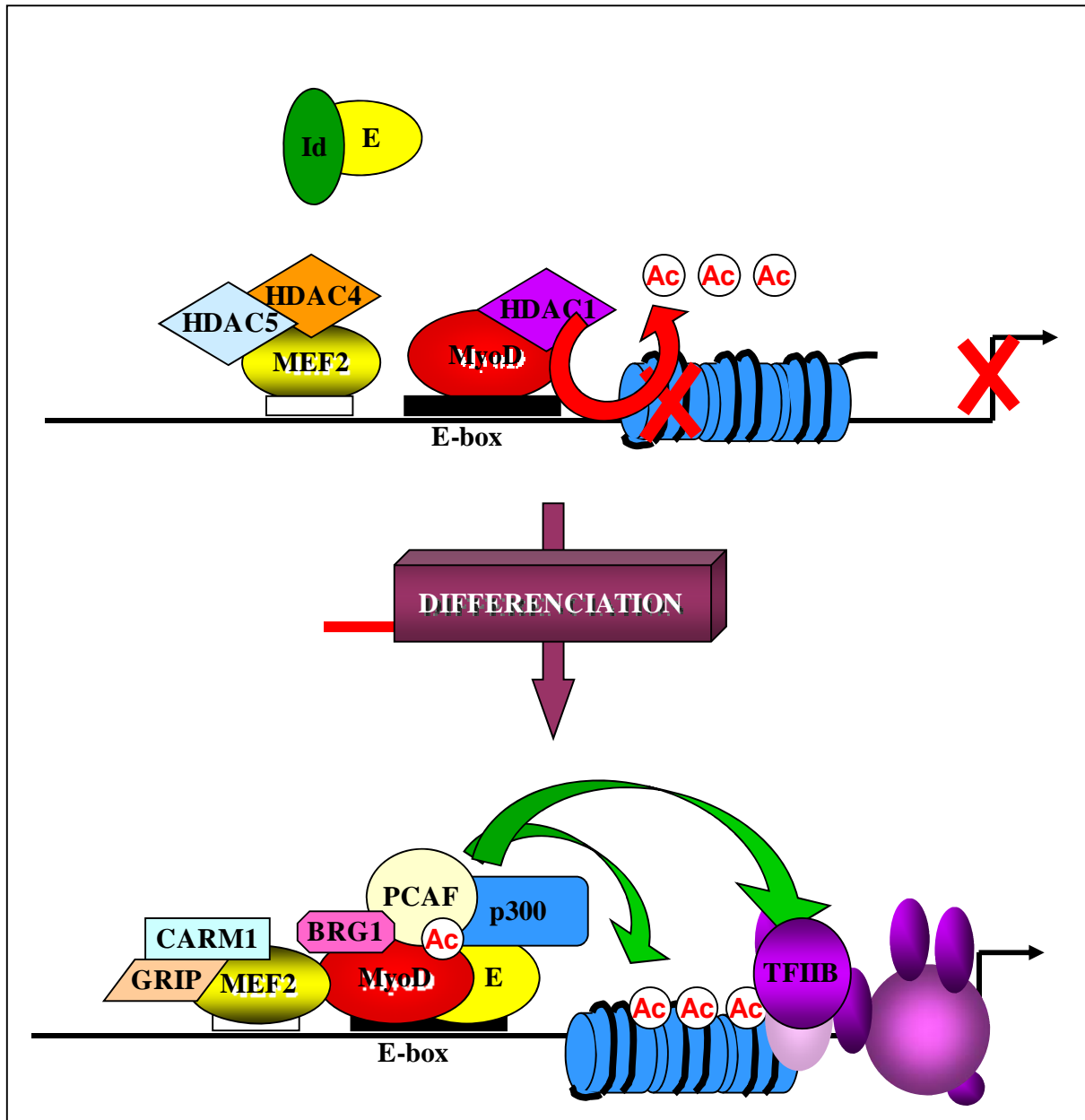
Au cours de la prolifération cellulaire, MyoD est donc réprimé par les activateurs du cycle cellulaire, cyclines, cdk et E2F ainsi que par les facteurs de croissance. Le retrait des facteurs de croissance permet de lever l'inhibition de MyoD. MyoD active alors les inhibiteurs du cycle cellulaire p21 et Rb, inhibe ainsi l'activité des cycline/ckd et l'activation d'E2F par la phosphorylation de Rb (Puri *et al.* 1997b; Walsh and Perlman 1997). MyoD lui-même participe donc à l'arrêt du cycle cellulaire des cellules myogénique et engage la différenciation musculaire.

### c) Rôle des co-régulateurs transcriptionnels

Les MRF, comme MyoD, sont capables de modifier la structure de la chromatine de leurs gènes cibles. De nombreuses études démontrent la nécessité pour les MRF d'interagir avec des co-activateurs, protéines modifiant la structure de la chromatine, afin d'accroître leur capacité d'activation transcriptionnelle (Figure 10) (McKinsey *et al.* 2001).

Il existe trois classes principales de co-activateurs connues pour interagir avec les facteurs de transcription : les enzymes de modification des histones, les histones acétyltransférases et histones-méthylases, les facteurs de remodelage de la chromatine SWI/SNF et les protéines de la famille TRAP/Mediator family. Aussi bien les histones-acétyltransférases, HAT, que les histones déacétylases, HDAC interagissent avec MyoD. Ces deux classes agissent de façon opposée sur l'activité de MyoD et permettent d'activer ou de réprimer MyoD en fonction du contexte cellulaire, en coopération avec le complexe SWI/SNF (de la Serna *et al.* 2001; Roy *et al.* 2002).

L'activité HAT augmente au cours de la myogenèse et les protéines HAT p300/CBP sont requises pour l'expression des gènes muscle-spécifiques (Puri *et al.* 1997a; Polesskaya *et al.* 2001b). Dans les myotubes C2C12, MyoD co-immunoprécipite avec p300 et une autre protéine HAT, PCAF. Ce trimère se lie au niveau de motif E-Box (Puri *et al.* 1997c). P300 et PCAF agissent de façon coordonnée pour stimuler les capacités transcriptionnelles de MyoD (Dilworth *et al.* 2004). P300/CBP induit la transcription en interagissant avec les protéines du complexe TFIID de la machinerie basale de transcription (Eckner *et al.* 1996; Yuan *et al.* 1996); (Sartorelli *et al.* 1997). L'activité acétyltransférase de PCAF agit directement sur MyoD pour accroître son activité transcriptionnelle, en augmentant son affinité pour l'ADN et renforçant sa liaison à p300 (Figure 10) (Polesskaya *et al.* 2001a).



**Figure 10:** régulation de l'activité transcriptionnelle de MyoD par les cofacteurs transcriptionnels

d'après Mac Kinsey *et al.* 2001a

Les HDAC sont responsables de l'inhibition de certains gènes muscle-spécifiques, en interagissant avec MyoD et MEF2 (Lu *et al.* 2000; Dressel *et al.* 2001; McKinsey *et al.* 2001). Les HDAC de classe II, HDAC4 et HDAC5, sont recrutées par MEF2 et inhibent l'activité transcriptionnelle de MyoD. Les HDAC de classe I, en revanche, s'associent directement à MyoD pour le dé-acétyler et ainsi inhiber son activation par PCAF (Figure 10) (Puri *et al.* 2001). Le complexe MyoD/HDAC1 est présent dans les myoblastes non différenciés mais pas dans les myotubes différenciés (Mal *et al.* 2001).

L'interaction des protéines de la famille MyoD et de la famille MEF2 avec les HAT et les HDAC est un mécanisme finement régulé, l'équilibre entre l'activité HAT et HDAC jouant un rôle crucial dans le contrôle de la différenciation myogénique (McKinsey *et al.* 2001). Ainsi, au cours de la différenciation, la protéine Rb, inhibiteur du cycle cellulaire, se lie à HDCA1. Elle libère ainsi MyoD qui peut alors activer la transcription des muscle-spécifiques en recrutant p300 et PCAF (Puri *et al.* 2001).

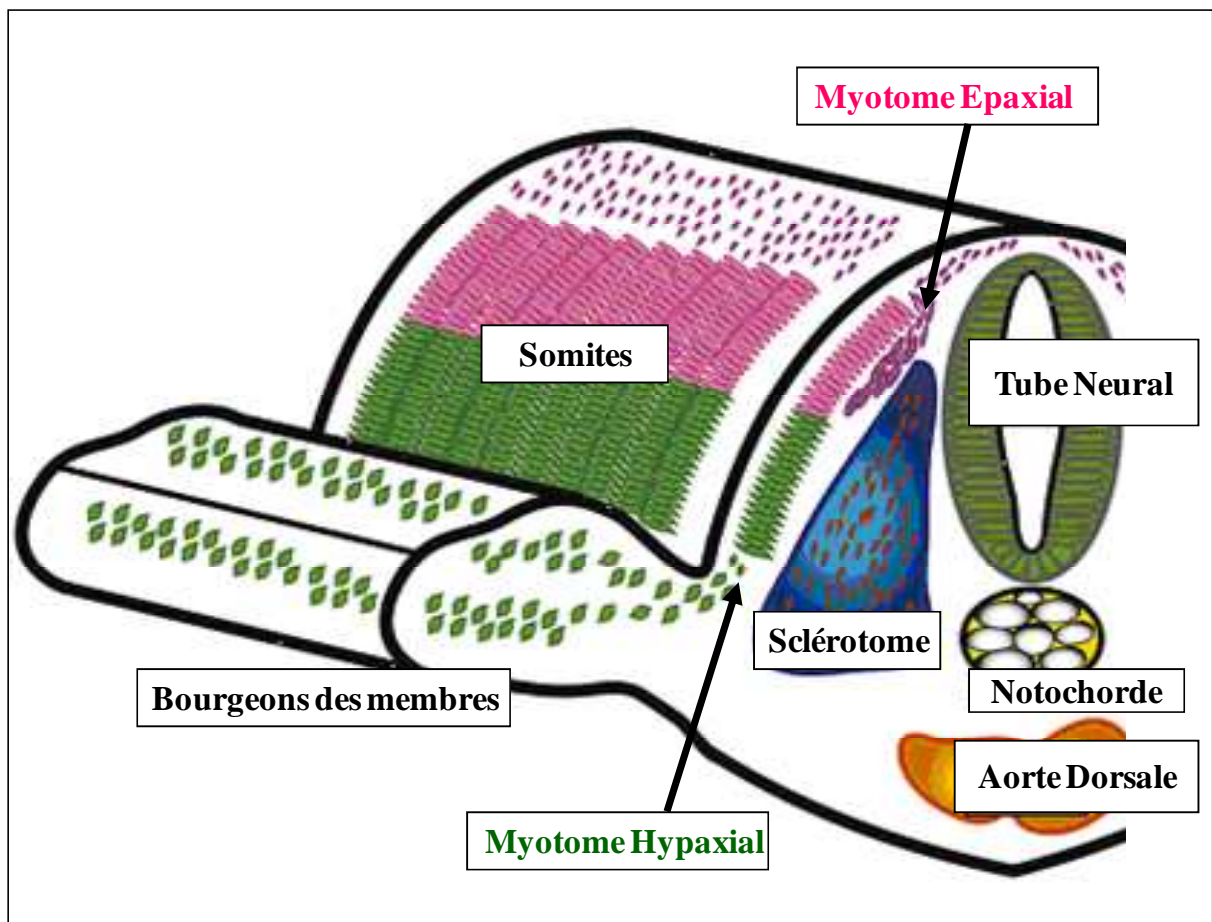
Les histones-méthylases sont également impliquées dans le processus de différenciation musculaire. Ainsi, la protéine CARM1, arginine methyltransférase 1, favorise la myogenèse, en formant un trimère avec le co-activateur du récepteur aux stéroïdes GRIP, et MEF2C (Dacwag *et al.* 2009). BRG1 et BRM, les homologues du complexe SWI/SNF de la drosophile chez les mammifères, sont également nécessaires à la différenciation myogénique des cellules exprimant MyoD (de la Serna *et al.* 2001; Simone *et al.* 2004). Des expériences d'immunoprécipitation sur des extraits nucléaires de cellules C2C12 différenciées ont montré l'interaction de MyoD, MEF2C, p300, PCAF et BRG1 ( Figure 10) (Berkes and Tapscott 2005).

La structure de la chromatine détermine l'accessibilité d'un gène aux facteurs de transcription et donc son état d'activation (Wigler *et al.* 1979). La détermination cellulaire, engageant une cellule dans un processus de différenciation donné, requiert l'activation de gènes auparavant silencieux. Ceci nécessite un remodelage de la chromatine au niveau du promoteur de ces gènes. L'activation de ces gènes est réalisée grâce à l'action de facteurs dits « pionniers » (Cirillo *et al.* 2002). La capacité de MyoD à interagir avec de nombreuses enzymes de modifications de la chromatine lui permet d'activer les gènes de la myogenèse même s'ils sont silencieux et de convertir ainsi tout type de cellules en cellules musculaires. MyoD joue donc le rôle de facteur pionnier dans les processus de détermination et de différenciation musculaires (Gerber *et al.* 1997; Tapscott 2005).

## 1.2. Les MRF dans la myogenèse embryonnaire

### 1.2.1. Mécanismes de la myogenèse

La plupart des muscles squelettiques des vertébrés dérive des somites embryonnaires, structures épithéliales sphériques, situées de part et d'autre du tube neural (Figure 11) (Stockdale 1992).



**Figure 11:** Somitogenèse: différenciation du dermomyotome

d'après Hawke et Garry, 2001

Chez les vertébrés, on distingue deux types de muscles striés : d'une part, les muscles épaxiaux et paraxiaux, associés à la colonne vertébrale, et d'autre part les muscles hypaxiaux, qui constituent la musculature du tronc, de la ceinture abdominale et des membres. Ces deux catégories de muscles ont des origines somitiques différentes et sont issues de deux lignages musculaires distincts.



Les cellules du compartiment dorso-médian du somite sont à l'origine du lignage épaxial alors que les cellules de la région ventro-latérale du somite donnent naissance au lignage musculaire hypaxial (Figure 11) (Ordahl and Le Douarin 1992; Brand-Saberi and Christ 2000). La compartimentalisation et la détermination des somites sont régies par des facteurs exprimés par les structures axiales ou latérales de l'embryon. Ainsi, les facteurs Shh, Sonic Hedgehog et Wnt, ont été décrits pour induire la myogenèse de façon synergique (Munsterberg *et al.* 1995). Secrété par la notochorde et la plaque du plancher du tube neural, Shh joue un rôle important dans la compartimentalisation des somites, assure leur survie et induit la détermination du myotome épaxial (Johnson *et al.* 1994a; Johnson *et al.* 1994b).

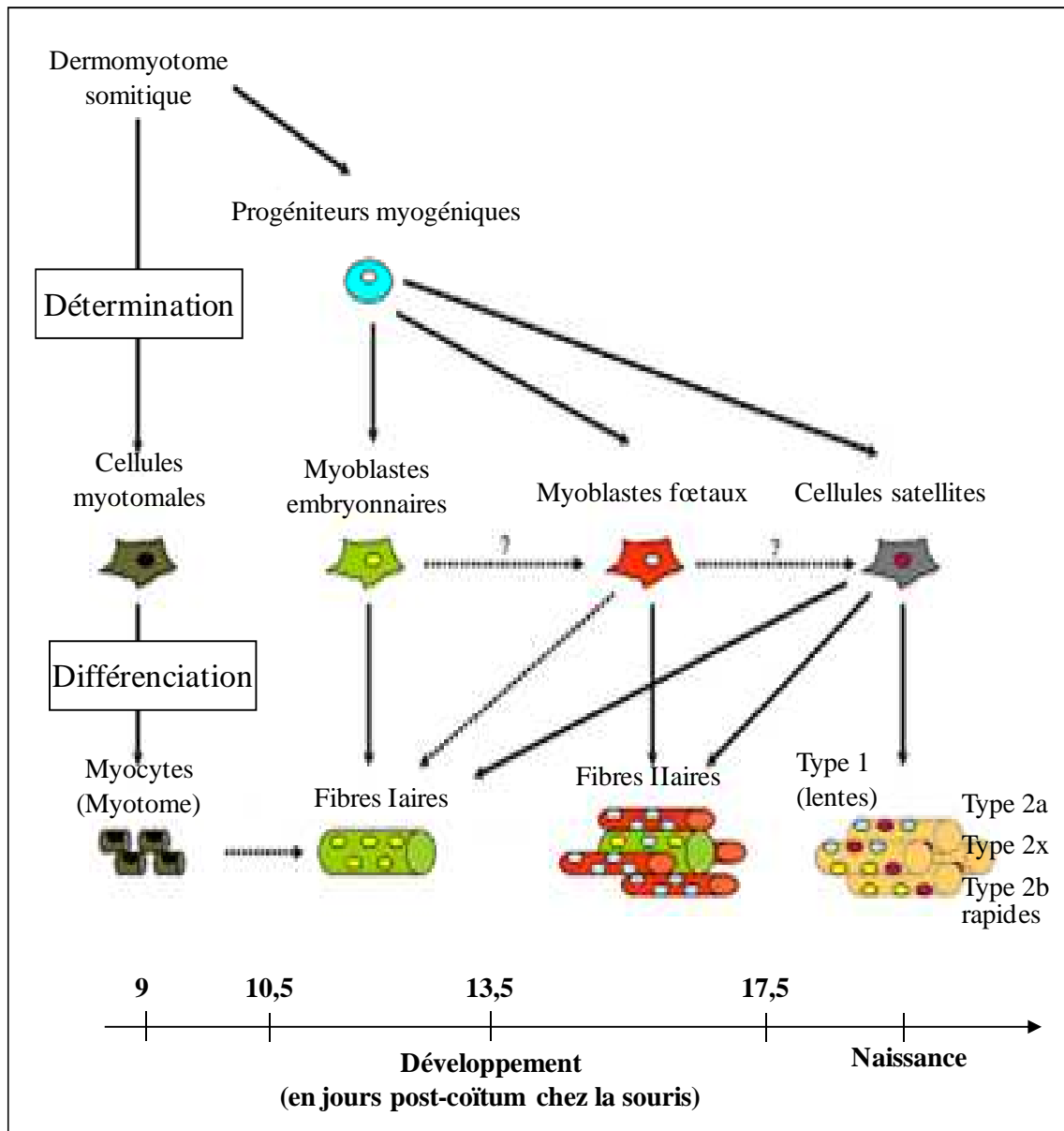
Les cellules du myotome hypaxial délaminent à partir du dermomyotome épithélial et migrent vers les bourgeons des membres embryonnaires (Figure 11) (Buckingham 2001). La délamination et la migration des cellules du myotome hypaxial dépendent de l'expression du récepteur c-met, dont le ligand est le facteur HGF, ou Scatter Factor, produit par le mésoderme latéral. HGF délimite la voie de migration pour les myoblastes présomptifs jusqu'aux bourgeons des membres. L'expression de *C-MET* est activée par le facteur de transcription Pax3 (Dietrich *et al.* 1999). Pax3 est nécessaire à la détermination et à la survie des cellules hypaxiales, ainsi qu'à leur délamination du dermomyotome et à leur migration.

La formation des muscles au cours du développement est un processus progressif résultant de la migration de plusieurs vagues successives de cellules musculaires (Figure 12) (Perry and Rudnick 2000; Buckingham *et al.* 2003).

Au cours de la myogenèse primaire, les myoblastes embryonnaires fusionnent pour former les myotubes de première génération, ou myotubes primaires, principalement à l'origine des fibres lentes.

Au cours de la myogenèse secondaire, la croissance de la masse musculaire s'intensifie et l'innervation des muscles commence. L'innervation est indispensable au maintien de la génération primaire et à la mise en place de la génération secondaire. Celle-ci résulte de l'activité des myoblastes secondaires, ou fœtaux, présents autour des fibres primaires. Ils vont se multiplier puis fusionner pour former les fibres secondaires à l'origine en majorité des fibres rapides (Van Swearingen and Lance-Jones 1995).

Une troisième vague de migration est à l'origine des cellules satellites, ou myoblastes adultes. Ces cellules sont responsables de la croissance musculaire post-natale et de la régénération musculaire chez l'adulte (Feldman and Stockdale 1992; Buckingham and Montarras 2008).



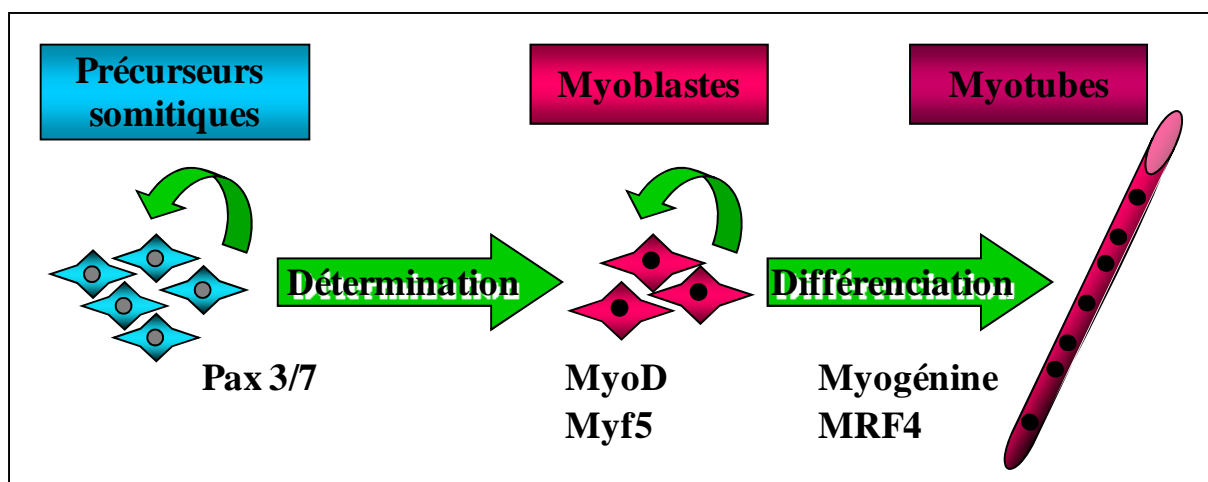
**Figure12: Lignages myogéniques et formation des fibres musculaires**

d'après Biressi *et al.* 2007

### 1.2.2. Expression des MRF au cours de la myogenèse

La remarquable capacité de chaque MRF à convertir en myoblaste toute cellule non musculaire dans laquelle ils sont exprimés pourrait faire supposer que les 4 MRF possèdent une fonction identique de facteur déclencheur de la myogenèse. Cependant, même s'ils apparaissent tous les quatre de manière précoce au cours du développement embryonnaire, leur expression spatio-temporelle est très différente aussi bien au sein de l'embryon que dans les lignées cellulaires *in vitro* (Arnold and Braun 1996).

Dans les lignées cellulaires musculaires, MyoD et/ou Myf5 sont exprimés dans les myoblastes prolifératifs avant l'engagement dans le processus de différenciation musculaire, et sont toujours présents dans les myotubes en différenciation. Au contraire, l'expression de la myogénine n'augmente que lorsque les cellules commencent à se différencier. L'expression de MRF4 n'est détectée qu'après la différenciation (Montarras *et al.* 1991). Chaque MRF semble donc avoir un rôle spécifique au cours du processus myogénique : Myf5 et MyoD dans la détermination myogénique et la myogénine et MRF4 dans la différenciation terminale (Figure 13).



**Figure 13:** Rôle des MRF au cours de la différenciation myogénique

D'après Sabourin et Rudnicki, 2000

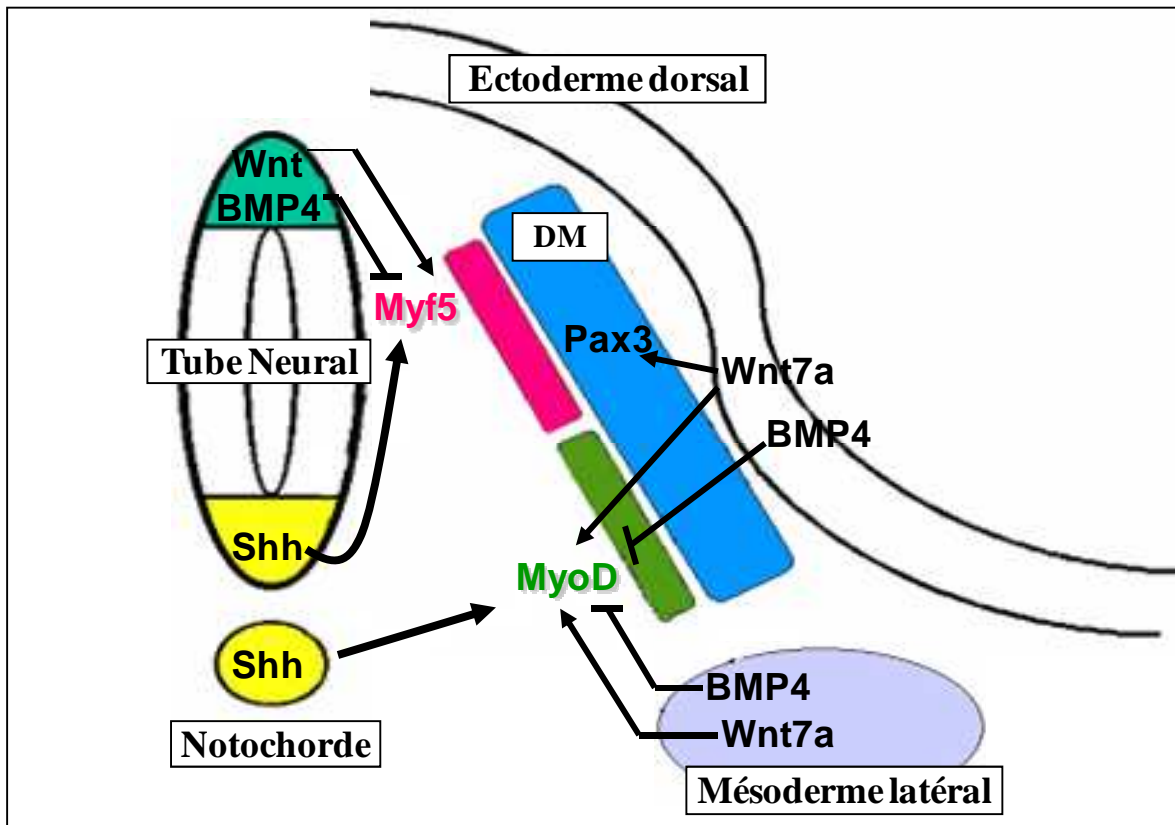
Au cours du développement, l'expression spatio-temporelle des MRF a été déterminée par hybridation *in situ* sur des embryons de souris.

Au cours de l'embryogenèse, l'expression de Myf5 ou MyoD est le marqueur le plus précoce de détermination myogénique. Myf5 apparaît aussitôt après la segmentation des somites. Son expression est restreinte, dans un premier temps, aux cellules de la région dorso-médiane du dermomyotome, futur myotome épaxial (Ott *et al.* 1991). MyoD est exprimé peu après Myf5, dans le dermomyotome hypaxial (Sassoon *et al.* 1989). Myf5 apparaît ainsi impliqué dans la détermination du lignage épaxial alors que MyoD détermine le lignage hypaxial. L'expression de Myf5 est transitoire, déclinant seulement quelques jours après son apparition, contrairement à l'expression de MyoD qui reste constante tout au long du développement.

L'expression de Myf5 dans le myotome épaxial est activée par Shh. Une déficience en Shh chez la souris induit une réduction de l'expression de Myf5 au niveau du myotome épaxial, sans affecter la formation du myotome hypaxial et l'expression de MyoD (Chiang *et al.* 1996; Borycki *et al.* 1999). Plusieurs facteurs Wnt ont été décrits pour induire la myogenèse de façon synergique avec Shh (Munsterberg *et al.* 1995). Wnt-1, exprimé par le tube neural dorsal, induit l'expression de Myf5 alors que Wnt-7a, sécrété par le mésoderme latéral, induit l'expression de MyoD (Tajbakhsh *et al.* 1998). Ainsi, le tube neural est responsable de l'induction de l'expression de Myf5 au sein du myotome épaxial, alors que le mésoderme latéral induit préférentiellement l'expression de MyoD au sein du myotome hypaxial (Figure 14). Le facteur de transcription Pax3 est également un régulateur important de la myogenèse (Buckingham and Relaix 2007). Les souris *spotch*, mutants naturels du gène Pax3, ne développent aucune musculature au niveau des membres (Franz *et al.* 1993). La mise au point de souris *spotch* KO *Myf5* démontre l'implication de Pax3 dans l'activation de l'expression de *MyoD*, indépendamment de Myf5 (Tajbakhsh *et al.* 1997).

La myogénine est détectée dans les cellules somitiques tout de suite après l'apparition de Myf5 et son expression, comme celle de MyoD, persiste tout au long du développement (Sassoon *et al.* 1989).

MRF4 est le dernier à apparaître au sein du myotome. Son expression est bi-phasique : d'abord restreinte au myotome, elle disparaît rapidement pour réapparaître à la fin de l'embryogenèse et persister après la naissance (Bober *et al.* 1991).



**Figure 14:** Régulation de l'expression des MRF au cours la myogenèse

D'après Perry et Rudnicki, 2000

Dans les bourgeons des membres, l'apparition des MRF est légèrement décalée. Après la délamination à partir du myotome hypaxial et au cours de leur migration, les myoblastes présomptifs n'expriment aucun des MRF (Delfini *et al.* 2000). La construction de chimères poulet-caille a en effet permis de montrer que ces cellules sont engagées dans le processus myogénique lorsqu'elles migrent mais n'expriment pas les MRF avant d'atteindre les bourgeons des membres (Pourquie *et al.* 1995; Pourquie *et al.* 1996). La surexpression cellulaire de Pax3 indique qu'il maintient les myoblastes en migration dans un état indifférencié (Amthor *et al.* 1998). Son expression augmente lorsque les cellules hypaxiales sont exposées aux BMP, sécrétés par l'ectoderme dorsal, le mésoderme latéral et les bourgeons des membres (Figure 14). Les BMP, facteurs de la famille TGF $\beta$ , sont des inhibiteurs de la myogenèse. Leur expression au niveau des bourgeons des membres favorise la migration des myoblastes présomptifs et inhibe leur différenciation en réprimant l'expression des MRF (Amthor *et al.* 1998).

Les myoblastes subissent ensuite une phase de prolifération intensive au sein des bourgeons des membres. Dans les embryons de poulet, les myoblastes prolifératifs

n'expriment ni MyoD ni Myf5. Chez la souris, l'expression de Myf5 et de MyoD apparaît dès l'arrivée des myoblastes au niveau des bourgeons des membres, suivie très rapidement par l'expression de la myogénine. Contrairement à ce qui se passe dans le somite, MRF4 n'apparaît que très tardivement, de façon concomitante avec la formation des myotubes secondaires et le début de l'innervation.

Directement ou indirectement, les signaux émis par le tube neural, la chorde ou encore le mésoderme latéral conduisent à l'activation des facteurs de détermination myogénique Myf5 ou MyoD. L'expression spatio-temporelle de ces MRF est régulée par des régions promotrices spécifiques.

Ainsi, la régulation de *MYOD* dépend de deux séquences promotrices distinctes. Un premier élément proximal dirige l'expression de *MYOD* au cours de la différenciation terminale des myoblastes en myotubes et fibres musculaires. Un second élément distal dirige l'expression domaine-spécifique de *MYOD* au sein des somites (Asakura *et al.* 1995; Goldhamer *et al.* 1995).

Les séquences régulatrices de *MYF5* s'étendent sur 96 kb en amont de son gène chez la souris. Les éléments proximaux dirigent son expression précoce au sein des somites non compartimentalisés, un élément dit épaxial dirige l'expression de *MYF5* au sein du dermomyotome épaxial, enfin un élément distal régule l'expression de *MYF5* au sein du myotome épaxial et des bourgeons des membres (Hadchouel *et al.* 2000; Summerbell *et al.* 2000).

Ainsi, la signalisation complexe émise par les tissus embryonnaires entourant le somite est intégrée au niveau de séquences de régulation complexes au niveau du promoteur de *MYOD* ou de *MYF5* pour aboutir à la détermination du lignage musculaire épaxial exprimant Myf5 ou du lignage hypaxial exprimant MyoD (Tapscott 2005).

### **1.2.3. Rôle des MRF dans la myogenèse : apport des souris transgéniques**

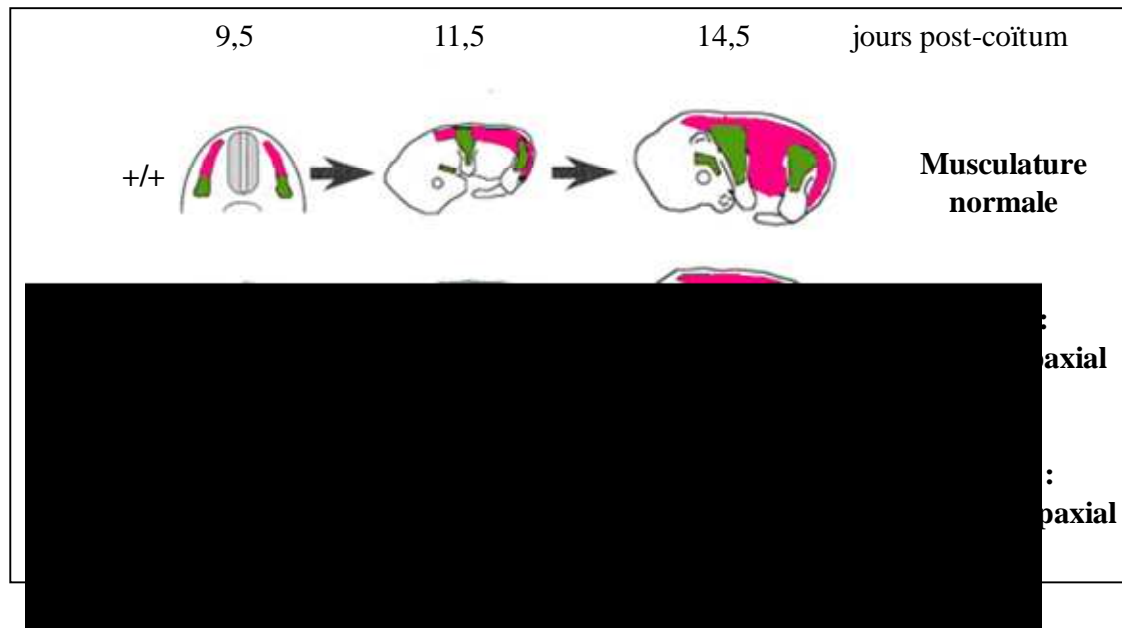
Le rôle essentiel des MRF dans le développement musculaire a été clairement mis en évidence grâce à la construction de souris KO pour chacun des quatre facteurs. Leur inactivation au sein d'embryons de souris a permis une meilleure compréhension des mécanismes de détermination et de maintenance des lignages myogéniques (Arnold and Braun 1996).

Les souris invalidées pour *myod* sont viables et leur musculature squelettique ne comporte aucun défaut. L'histologie des muscles squelettiques, la structure du sarcomère ainsi que l'expression des gènes muscle-spécifiques ne sont pas altérées. MyoD n'apparaît donc pas essentiel à l'initiation et à la progression de la myogenèse. Chez ces mutants, les niveaux d'expression de la myogénine et de MRF4 sont similaires aux souris sauvages. Par contre, l'expression de Myf5 qui normalement disparaît rapidement au cours du développement est très élevée. Ainsi, le maintien et l'augmentation de l'expression de Myf5 compensent la perte de MyoD et permet la réalisation normale du développement musculaire (Rudnicki *et al.* 1992).

Le KO de *myf5*, comme celui de *myod*, ne provoque aucune altération du développement musculaire. Cependant, les souris *myf5* *-/-* meurent peu après leur naissance à cause d'une incapacité à respirer, due à un grave défaut de développement des côtes. L'absence de Myf5 n'a donc pas d'effet majeur sur le développement musculaire. Le niveau d'expression des autres MRF n'est pas modifié chez ces mutants, mais la formation du myotome est retardée. Les premières cellules myotomales apparaissent lorsque l'expression de MyoD est activée, puis la myogenèse se poursuit normalement. MyoD peut donc initier la myogenèse indépendamment de Myf5 (Braun *et al.* 1992; Braun *et al.* 1994).

Les souris porteuses d'une délétion en *myf5* ou *myod* possèdent une musculature squelettique complète, suggérant qu'individuellement MyoD et Myf5 ne sont pas nécessaires à la myogenèse. Les doubles mutants *myod/myf5* *-/-*, quant à eux, montrent une absence totale de muscle squelettique. Ils n'expriment aucun gène muscle-spécifique ni aucun MRF. L'analyse histologique révèle l'absence complète de cellule myogénique au sein des régions où se forment normalement les muscles. Ces régions sont peuplées de cellules mésenchymateuses ou comblées par les organes internes. Ces résultats démontrent que l'expression de MyoD ou Myf5 est requise pour la détermination myogénique des cellules embryonnaires et que l'expression de la myogénine et de MRF4 dépend d'au moins un de ces deux facteurs (Rudnicki *et al.* 1993).

Les souris KO *myf5* présentent toutefois un retard dans le développement des muscles paraspinaux et intercostaux, alors que les souris KO *myod* présentent un développement normal des muscles épaxiaux mais un retard dans la formation des muscles hypaxiaux. Ces résultats démontrent que la détermination du lignage épaxial dépend de Myf5 et la détermination du lignage hypaxial de MyoD (Figure 15) (Kablar *et al.* 1998).



**Figure 15. Myogenèse chez les souris sauvages, déficientes en MyoD ou déficientes en Myf5**

d'après Sabourin et Rudnicki, 2000

L'inactivation du gène de la myogénine entraîne une réduction drastique de la masse musculaire. L'analyse histologique des souris myogénine *-/-* montre une déficience sévère en fibres musculaires matures, remplacées par des cellules myogéniques mononuclées. Les régions de développement musculaire présentent un nombre de noyaux cellulaires similaire aux souris sauvages. Chez ces mutants, la détermination des myoblastes au sein du myotome ainsi que leur migration ont lieu normalement mais ces myoblastes sont incapables de se différencier en l'absence de myogénine. Aucun des trois autres MRF, MyoD Myf5 ou MRF4 ne peut compenser l'inactivation de la myogénine pour la différenciation terminale (Hasty *et al.* 1993; Nabeshima *et al.* 1993).

Trois laboratoires différents ont réalisé le KO de *mrf4* (Braun and Arnold 1995; Patapoutian *et al.* 1995; Zhang *et al.* 1995). Ces souris mutantes *mrf4**-/-* présentent un phénotype similaire aux souris *myf5* *-/-*, avec une altération dans la formation des côtes plus ou moins importante, pouvant induire la létalité dans les cas les plus extrêmes. Ce phénotype



est lié à des perturbations dans l'expression de Myf5, probablement dues à la proximité chromosomique des gènes *mrf4* et *myf5* (Olson *et al.* 1996; Yoon *et al.* 1997). Un seul KO *mrf4* ne modifie pas l'expression de *myf5* et les souris mutantes résultantes de cette invalidation sont parfaitement viables (Zhang *et al.* 1995). Dans tous les cas, le développement musculaire n'est pas altéré par l'inactivation de *mrf4*. Les mutants présentent une forte élévation de l'expression de la myogénine. Celle-ci compense donc l'absence de MRF4.

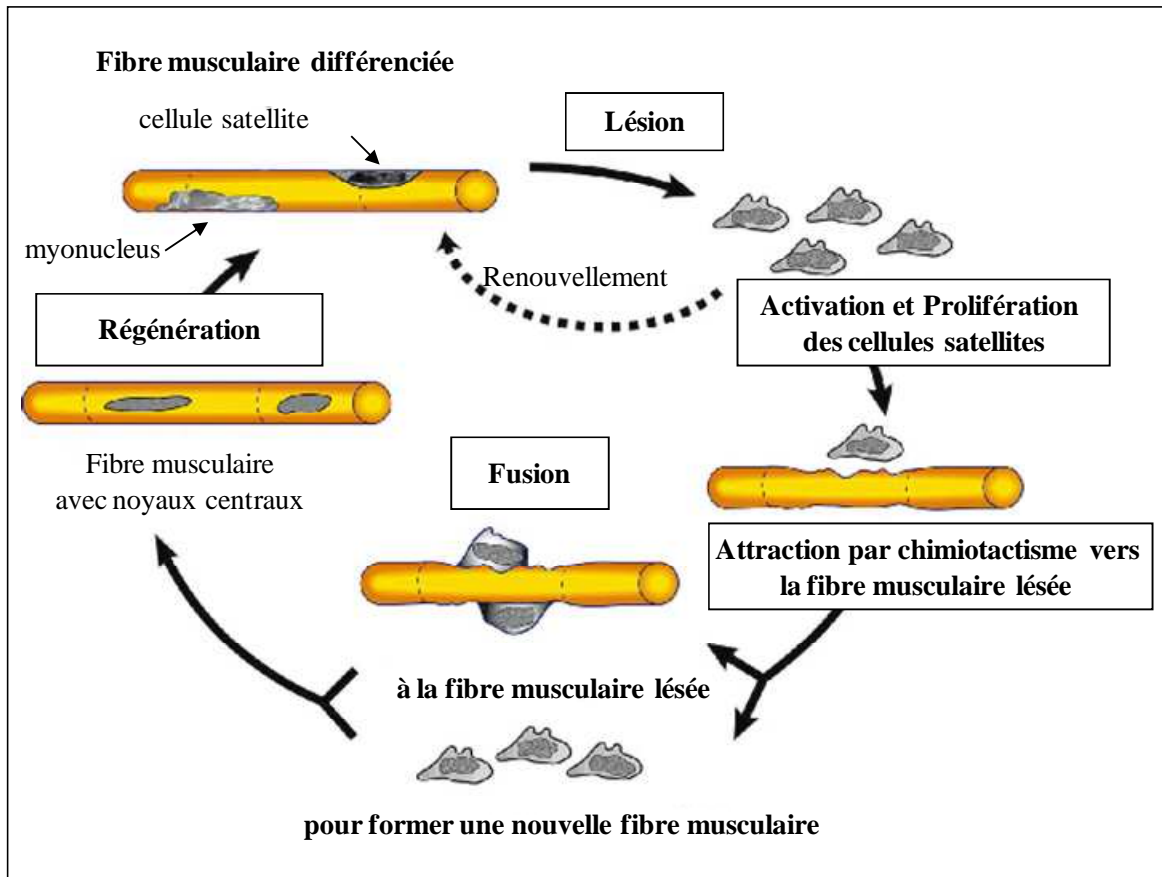
L'inactivation simultanée de plusieurs MRF a également été réalisée : les souris porteuses d'une double délétion pour le gène de la myogénine et de MyoD, ou de la myogénine et Myf5, ou de la myogénine et MRF4 ainsi que des souris déficientes pour tous les MRF sauf Myf5. Elles développent toutes le même phénotype que les souris *myog* *-/-* (Rawls *et al.* 1995; Rawls *et al.* 1998; Valdez *et al.* 2000). Les souris double mutantes *myod* *-/-* et *mrf4* *-/-* présentent également un phénotype similaire aux souris *myog* *-/-* (Rawls *et al.* 1998). La myogénine ne peut donc compenser l'inactivation de *mrf4* en absence de MyoD. Ces données suggèrent que la myogénine et MyoD d'une part et MRF4 et Myf5 d'autre part déterminent deux lignages myogéniques distincts.

Les données fournies par l'observation des souris transgéniques confirment donc que Myf5 et MyoD sont à l'origine de la détermination du lignage myogénique alors que la myogénine et MRF4 sont nécessaires à la différenciation terminale.

### **1.3. Les MRF dans la régénération musculaire**

Le muscle squelettique adulte possède de remarquables capacités d'adaptations aux variations physiologiques en période de croissance, en réponse aux variations nutritionnelles, à l'exercice, ou en cas de blessure. Ces capacités d'adaptations sont largement attribuées à une petite population de cellules mononuclées nommées cellules satellites. Elles demeurent quiescentes au sein du muscle. En réponse à un stimulus, elles sont activées, se divisent pour générer des myoblastes qui vont proliférer puis fusionner (Figure 16). Ce mécanisme contribue dans un premier temps à la croissance musculaire post-natale au cours de laquelle les cellules satellites fusionnent aux fibres musculaires adjacentes. Il est ensuite mis en jeu au cours du processus de régénération musculaire, afin que les cellules satellites activées suite à

une lésion reconstruisent de nouvelles fibres musculaires (Le Grand and Rudnicki 2007; Buckingham and Montarras 2008).

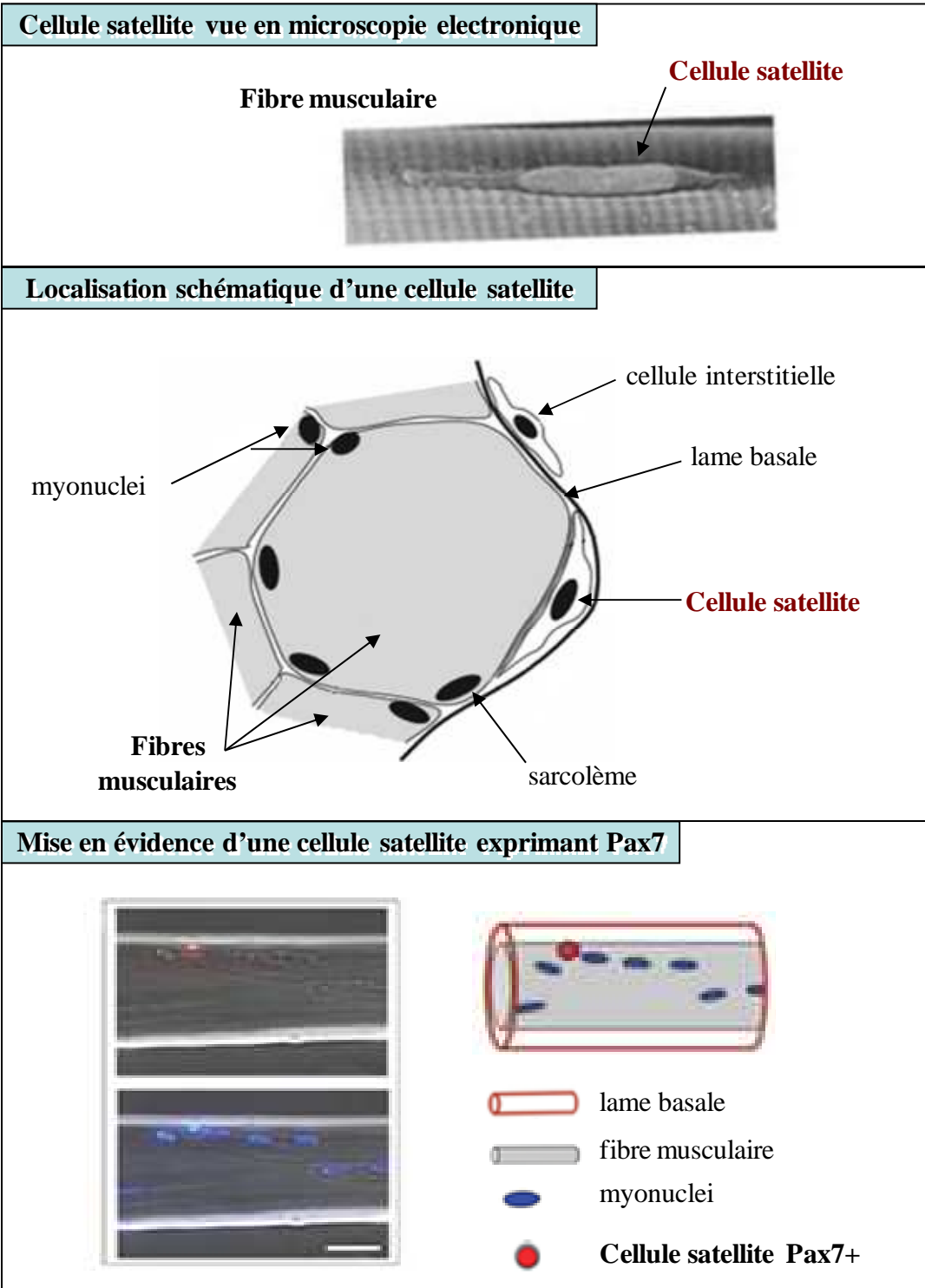


**Figure 16:** Processus de la régénération musculaire: rôle des cellules satellites

D'après Hawke et Garry, 2001

### 1.3.1. Nature et Origine des cellules satellites

Les cellules satellites ont été caractérisées pour la première fois par Alexander Mauro, en 1961, comme de petites cellules mononuclées situées en périphérie des fibres musculaires multinuclées. Les cellules satellites doivent donc leur nom à leur localisation, étroitement accolée aux fibres musculaires matures et intercalée entre la membrane plasmique et la membrane basale de la fibre musculaire (Figure 17) (Mauro 1961; Muir *et al.* 1965).



**Figure 17: Localisation des cellules satellites**

D'après Buckingham et Relaix, 2007; Legerlotz et Smith, 2008 ;  
Yablonka-Reuveni, 2008

Classiquement, les cellules satellites sont décrites pour dériver des somites embryonnaires (Le Douarin and Barq 1969; Christ *et al.* 1974). En 2005, une population de cellules exprimant Pax3 et son paralogue Pax7 est mise en évidence dans le myotome d'embryons de poulet et de souris (Ben-Yair and Kalcheim 2005; Gros *et al.* 2005; Kassari-Duchossoy *et al.* 2005; Relaix *et al.* 2005). Ces cellules sont en prolifération et n'expriment aucun marqueur musculaire. Cependant, elles peuvent s'engager dans le processus myogénique, exprimer MyoD et Myf5 puis être incorporées aux fibres musculaires squelettiques. Les cellules Pax3/7 positives du dermomyotome central engendrent les cellules satellites des muscles du tronc, alors que les cellules satellites des muscles des membres proviennent des cellules Pax3 positives ayant migrées à partir du dermomyotome hypaxial (Gros *et al.* 2005; Schienda *et al.* 2006).

Quelques études proposent une origine non somitique des cellules satellites (Hawke and Garry 2001). Ainsi, des cellules provenant de l'aorte embryonnaire dorsale pourraient générer des cellules satellites. De façon similaire aux cellules satellites adultes, elles expriment des marqueurs endothéliaux et des gènes muscle-spécifiques, et sont capables de contribuer à la croissance post-natale et à la régénération musculaire (De Angelis *et al.* 1999). Cependant, ces cellules ne semblent pas posséder de capacités myogéniques intrinsèques (Sherwood *et al.* 2004a). D'autre part, des cellules non-satellites pourraient être recrutées au cours du processus de régénération musculaire. Ainsi, des cellules souches de moelle osseuse, issues de greffe, ont été détectées dans des fibres musculaires régénérées (Ferrari *et al.* 1998). Les mésoangioblastes, cellules souches adultes associées aux vaisseaux sanguins, expriment Pax3 et possèdent d'efficaces capacités myogéniques (Minasi *et al.* 2002; Sampaolesi *et al.* 2003). Cependant, la contribution de cellules d'origines différentes des cellules satellites au processus de régénération musculaire est très mineure (Sherwood *et al.* 2004b).

### **1.3.2. Activation, différenciation et renouvellement des cellules satellites**

Dans des conditions physiologiques normales, les cellules satellites au sein du muscle adulte sont quiescentes, en phase G0 du cycle cellulaire. Toutefois, cet état de quiescence ne s'apparente pas à un état basal inactif mais résulte d'une répression transcriptionnelle active (Dhawan and Rando 2005). Ainsi la myostatine, membre de la super-famille TGF $\beta$ , exprimée dans les cellules satellites, maintient activement la quiescence en réprimant l'expression de MyoD par son action autocrine (McCroskery *et al.* 2003; Amthor *et al.* 2007). De même,

*Msx1*, marqueur des cellules satellites quiescentes, est impliqué dans la répression de l'expression des MRF (Houzelstein *et al.* 1999).

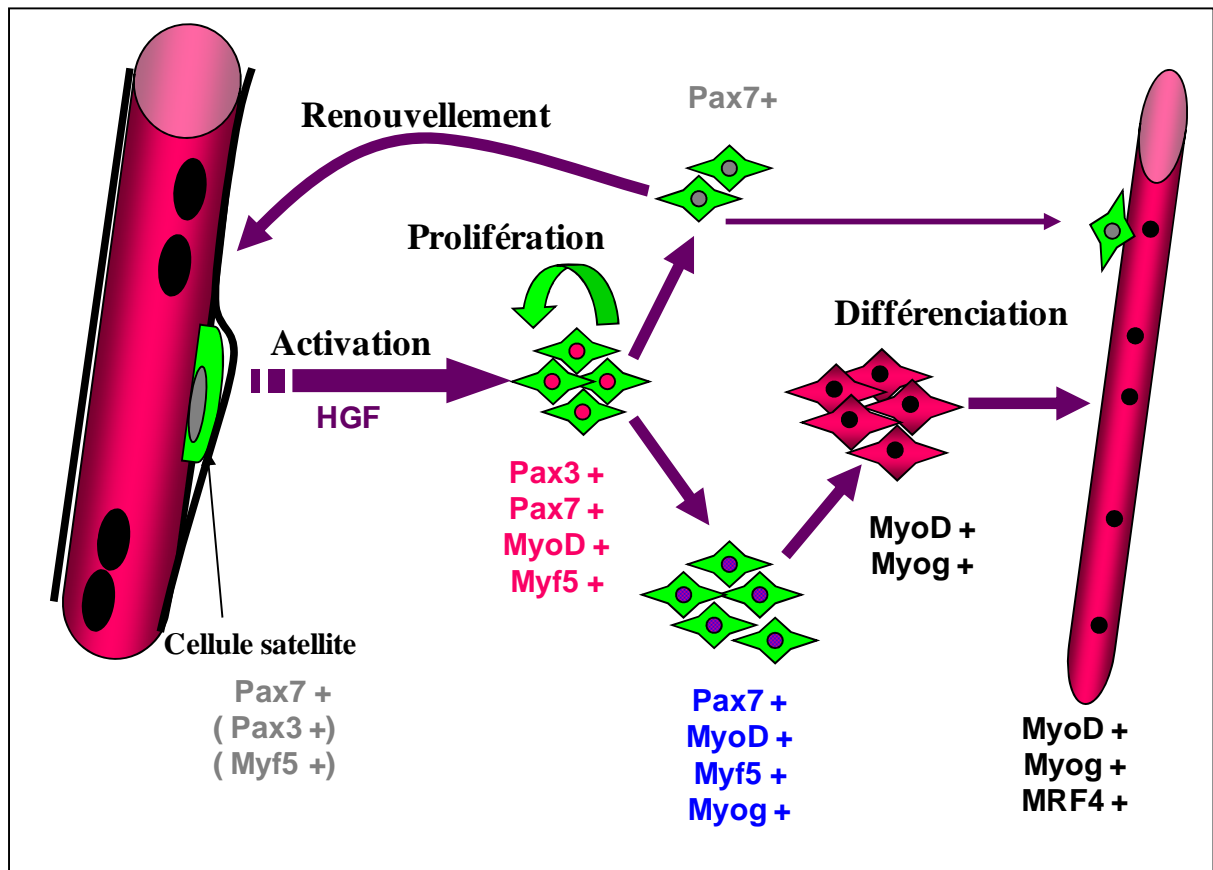
Toute perturbation de l'environnement des cellules satellites conduit à leur activation, attestant de l'importance des signaux extracellulaires. L'activation des cellules satellites dépend du facteur HGF, séquestré dans la matrice extracellulaire du muscle et libéré lors d'une lésion musculaire (Figure 18) (Tatsumi *et al.* 1998 ; Wozniak and Anderson 2007). De nombreux autres facteurs, largement redondants, stimulent l'activation des cellules satellites, comme les facteurs de croissance FGF ou l'activation de la voie Notch (Johnson and Allen 1995; Kastner *et al.* 2000; Luo *et al.* 2005).

L'activation des cellules satellites est un processus séquentiel. Tout d'abord, les cellules satellites sortent de leur état de quiescence par la transition de la phase G0 à la phase G1 du cycle cellulaire. Elles entrent alors dans une phase de prolifération intensive puis génèrent des myoblastes engagés dans le processus myogénique, qui vont se différencier et fusionner pour former de nouvelles fibres musculaires régénérées (Dhawan and Rando 2005).

Le pouvoir myogénique des cellules satellites repose sur l'expression de Pax3 et Pax7 et des MRF (Figure 18) (Le Grand and Rudnicki 2007). L'expression de Pax3 et Pax7 est fortement stimulée suite à l'activation des cellules satellites, au cours de leur phase proliférative (Spitz *et al.* 1998; Grifone *et al.* 2004; Relaix *et al.* 2006). Ces deux facteurs jouent alors un rôle similaire en activant le programme myogénique via l'expression de MyoD puis de la myogénine. Leur expression est ensuite réprimée, notamment par la myogénine, dès que les cellules s'engagent dans le processus myogénique (Figure 18) (Olguin *et al.* 2007).

Si au cours de la myogenèse embryonnaire MyoD et Myf5 jouent un rôle partiellement redondant et peuvent compenser l'absence l'un de l'autre, au cours de la régénération musculaire, leur deux rôles sont distincts. MyoD est nécessaire à la différenciation des myoblastes alors que Myf5 régule leur prolifération et leur survie (Relaix *et al.* 2006; Gayraud-Morel *et al.* 2007 ; Ustanina *et al.* 2007). Ainsi, Myf5 ne peut compenser complètement la perte d'expression de MyoD au cours de la myogenèse adulte, comme le prouve la régénération sévèrement altérée des souris MyoD<sup>-/-</sup> (Megoney *et al.* 1996; Sabourin *et al.* 1999; Yablonka-Reuveni *et al.* 1999).

Les facteurs de différenciation MRF4 et myogénine ne sont pas impliqués dans la maintenance et la prolifération des cellules satellites, mais l'induction de la myogénine est nécessaire à la différenciation des myoblastes en myotubes et en fibres musculaires (Figure 18). Comme preuve, les souris porteuses d'une délétion conditionnelle post-natale de la myogénine présentent une masse musculaire réduite (Knapp *et al.* 2006).



**Figure 18:** Expression des MRF au cours de l'activation des cellules satellites

d'après Buckingham, 2006

Après leur activation, les cellules satellites prolifèrent et donnent naissance majoritairement à des myoblastes qui s'engagent dans la myogenèse. Dans ces cellules l'expression de MyoD est activée alors que l'expression de Pax7 est réprimée. Cependant, une petite population de cellules maintient au contraire l'expression de Pax7 et perd l'expression de MyoD, via un mécanisme de division asymétrique. Ces cellules Pax7 positives retournent à l'état de quiescence pour renouveler le stock de cellules satellites (Figure 18) (Kuang *et al.* 2008).

Les capacités de différenciation des cellules satellites ainsi que leur capacité de renouvellement en font de véritables cellules souches musculaires adultes.

## **1.4. Les MRF dans le contrôle de la masse musculaire**

### **1.4.1. Plasticité musculaire**

Le développement musculaire aboutit à la formation d'une population finie de fibres musculaires polynucléées, issues de la fusion des précurseurs myogéniques. A partir de ce stade, toute croissance de la masse musculaire résulte d'un phénomène d'hypertrophie et non d'une hyperplasie. Tout au long de la vie de l'individu, la taille et la composition des fibres musculaires évoluent. Le muscle est en effet un organe doté d'une extrême plasticité lui permettant de s'adapter à toutes situations physiologiques ou pathologiques (Stewart and Rittweger 2006; Harridge 2007). D'abord engagées dans un processus hypertrophique, les fibres musculaires s'atrophient au cours du vieillissement et dans certaines situations pathologiques. L'hypertrophie se produit lors de la croissance post-natale mais également en réponse à une activité musculaire accrue ou à l'entraînement sportif. Au contraire, l'atrophie musculaire se développe lors du jeûne, d'une immobilisation prolongée, de lésions nerveuses ou au cours de pathologies associées à un état de cachexie telles que le cancer, le sida ou le diabète (Singleton and Feldman 2001; Schiaffino *et al.* 2007; Sandri 2008).

Les protéines myofibrillaires représentant 85% du volume d'une fibre musculaire, toute situation modifiant l'équilibre entre la synthèse et la dégradation protéique va entraîner un gain ou une perte de masse musculaire (Hoppeler 1986; Sandri 2008). Ainsi, l'hypertrophie est la résultante d'une forte induction de la synthèse protéique alors que l'atrophie résulte d'une rapide diminution de la synthèse et d'une augmentation marquée de la dégradation protéique. Les cellules satellites participent également au processus hypertrophique au cours de la croissance et en réponse à l'exercice, en fusionnant aux fibres existantes afin de toujours maintenir le ratio ADN/protéine constant (Roy *et al.* 1999; Adams 2006).

### **1.4.2. Implication des MRF dans la régulation de la masse musculaire**

Les deux protéines myofibrillaires essentielles à la contraction musculaire sont l'actine et la myosine. En plus de ces protéiques sarcomériques primordiales, d'autres protéines assurent le maintien de la structure et de la fonction sarcomérique, dont la Titine, très longue protéine, servant de matrice à la formation des filaments de myosine, les troponines I, C et T,

permettant la régulation de la contraction musculaire par le calcium, la Nébuline, assurant la stabilité des filaments d'actine, ou la desmine, assurant la stabilité du sarcomère lors de la contraction (Clark *et al.* 2002). L'expression de ces protéines spécifiquement musculaires est régulée par les MRF. Ainsi, MyoD régule l'expression des gènes codant pour les chaînes légères de la myosine, la desmine, les troponines I mais également la créatine kinase et plusieurs sous-unités du récepteur à l'acétylcholine (Lassar *et al.* 1989a; Piette *et al.* 1990; Lin *et al.* 1991; Wentworth *et al.* 1991; Li and Capetanaki 1993).

Si le rôle des MRF dans la myogenèse est bien établi, peu de choses sont connues sur leur rôle après la naissance. La persistance de leur expression dans le muscle squelettique adulte, même à de faibles niveaux pour MyoD, Myf5 et la myogénine, suggère qu'ils continuent de moduler l'expression des gènes muscle-spécifiques et pourraient contribuer à la plasticité musculaire (Walters *et al.* 2000a; Hespel *et al.* 2001). Des expériences menées sur des modèles animaux prouvent leur implication dans les processus de catabolisme et d'anabolisme musculaire (Favier *et al.* 2008; Legerlotz and Smith 2008).

L'augmentation de la charge musculaire est bien connue pour induire l'hypertrophie. Bien que ces données soient controversées, l'expression de MyoD, MRF4 et de la myogénine est augmentée au cours de ce modèle d'hypertrophie, avec toutefois des différences selon le type de muscle étudié, le protocole expérimental et sa durée (Table 1) (Loughna and Brownson 1996a; Loughna *et al.* 1996b; Carson and Booth 1998; Lowe *et al.* 1998; Adams *et al.* 2002; Haddad and Adams 2006; Bamman *et al.* 2007). L'expression de MyoD apparaît très sensible au stress mécanique et à la contraction musculaire ; très basse dans le muscle au repos, elle augmente dans les 24h suivant un exercice d'endurance comme de résistance (Yang *et al.* 2005). La myogénine, elle aussi, voit son expression stimulée par l'exercice et l'expression de MRF4 est induite par une supplémentation orale en créatine, favorisant l'hypertrophie musculaire (Adams *et al.* 1999; Hespel *et al.* 2001). L'élévation de l'expression des MRF au cours de la prise de masse musculaire pourrait s'expliquer par l'activation des cellules satellites participant à l'hypertrophie. Cependant, la suppression des cellules satellites par irradiation  $\gamma$  n'enraye pas le développement de l'hypertrophie musculaire (Lowe and Alway 1999). Dans ces fibres musculaires hypertrophiées, plus petites que celles obtenues par la fusion de cellules satellites, l'expression de MyoD et de la myogénine est maintenue. Au cours du processus hypertrophique, l'expression des MRF est donc bien induite au sein des noyaux des fibres musculaires (Ishido *et al.* 2004b).

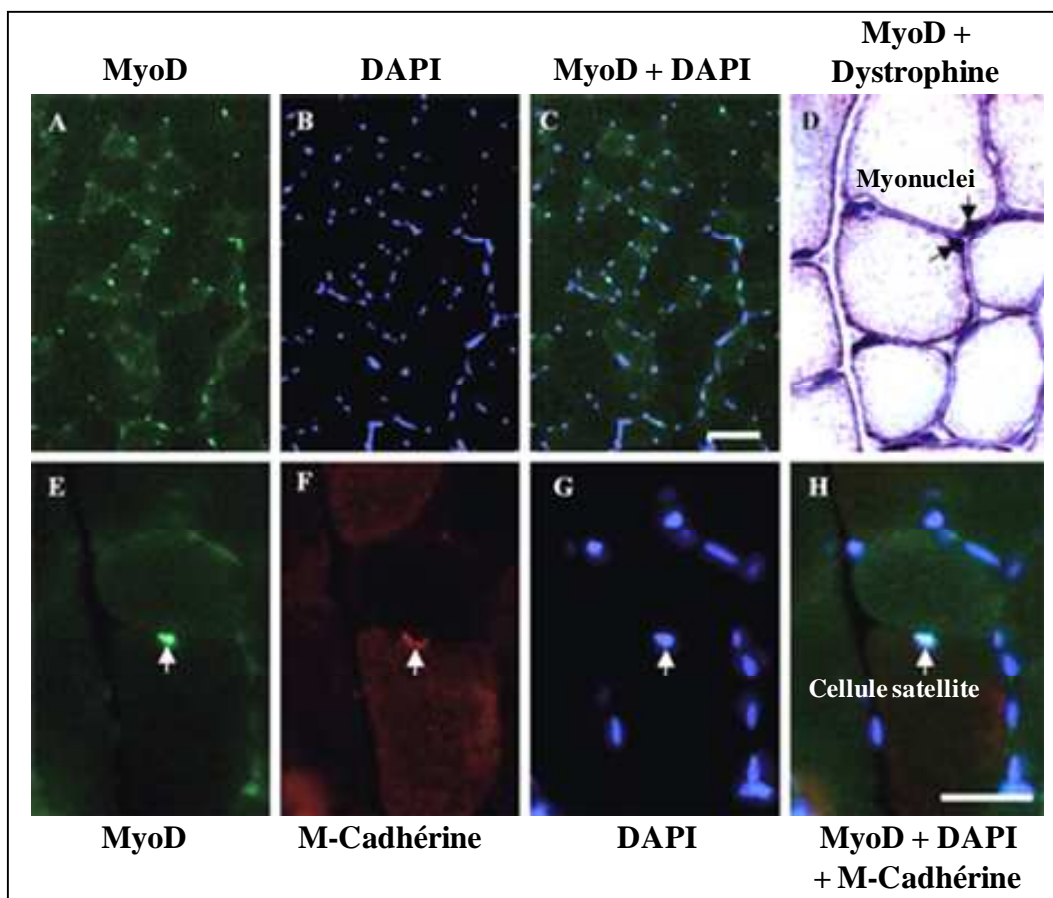


Modèle	Muscle	Espèce	Myf5	MyoD	Myogénine	MRF4	Référence
Aiguë							
Electrostimulation	<i>vastus lateralis</i>	Homme	↗		↗		Bickel <i>et al.</i> 2005
Electrostimulation	<i>gastrocnemius</i>	Rat			↗		Haddad et Adams 2006
Exercice en résistance	<i>vastus lateralis</i>	Homme		↗	↗	↗	Yang <i>et al.</i> 2005
Exercice en résistance	<i>vastus lateralis</i>	Homme	↗			↗	Raue <i>et al.</i> 2006
Chronique							
Entraînement en résistance (16 semaines)	<i>vastus lateralis</i>	Homme		↗	↗		Bamman <i>et al.</i> 2007
Entraînement en résistance (10 semaines)	<i>vastus lateralis</i>	Homme			↗		Hespel <i>et al.</i> 2001
Entraînement en résistance (8 semaines)	<i>vastus lateralis</i>	Homme			↗		Kvorning <i>et al.</i> 2007
Etirement (2-3semaines)	<i>Anterior latissimus dorsi</i>	Poulet			↗		Carson <i>et al.</i> 2000
Etirement (2 jours)	<i>plantaris</i>	Rat			↗		Louagna et Brownson, 1996
	<i>soleus</i>					↗	

**Table 1:** Expression des MRF au cours de l'hypertrophie musculaire induite par une activité musculaire accrue

D'après Favier *et al.* 2008

Les données concernant l'expression de ces mêmes MRF au cours de processus entraînant une atrophie musculaire apparaissent en revanche moins consensuelles. Lors de situation de décharges musculaires, suspension d'un membre ou d'une partie du corps (exemple rats suspendus par la queue) qui n'est alors plus soumis au poids du corps, quelques études rapportent une diminution ou pas de variation du niveau d'ARNm de MyoD ou de la myogénine tandis que d'autres rapportent une augmentation (Loughna and Brownson 1996; Mozdziak *et al.* 1999; Hespel *et al.* 2001; Haddad *et al.* 2003; Stevenson *et al.* 2003). Ainsi, l'expression de MyoD augmente dans le muscle soléaire de rat après 14 jours de suspension de la patte postérieure, ainsi que dans le biceps et le quadriceps après 7 jours de suspension de la patte antérieure. D'autre part de nombreuses études font part d'une induction rapide de MyoD dans le muscle squelettique dénervé (Hughes *et al.* 1993; Voytik *et al.* 1993; Walters *et al.* 2000a; Ishido *et al.* 2004a). Ces résultats semblent paradoxaux avec le rôle de MyoD dans l'activation des cellules satellites. L'immunomarquage de MyoD au cours d'expériences de dénervation musculaire montre qu'il est faiblement exprimé dans les cellules satellites mais fortement induit dans les noyaux des fibres musculaires (Figure 19) (Weis 1994; Haddad *et al.* 2003).



**Figure 19:** Localisation de l'expression de MyoD dans un muscle squelettique de rat 3 jours après dénervation

d'après Ishido *et al.* 2004

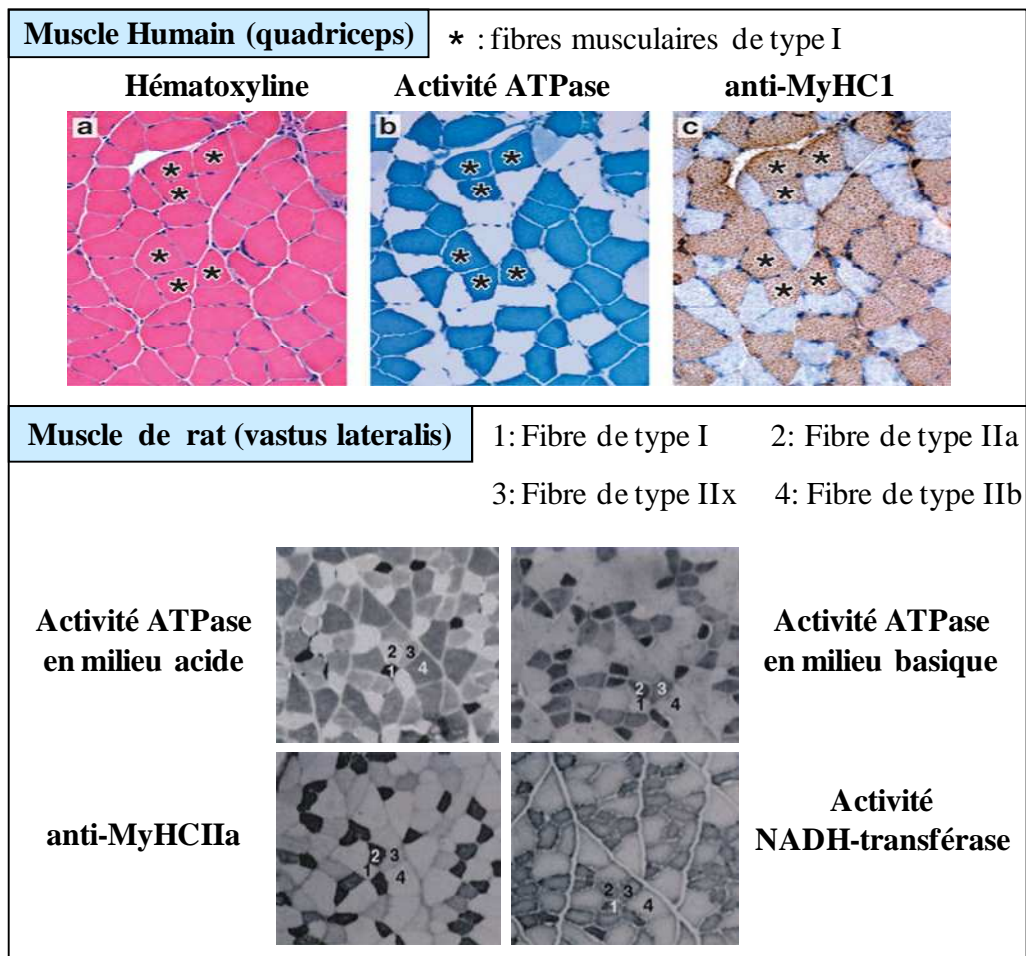
Cette activation contradictoire de MyoD dans les situations de diminution de l'activité du muscle est interprétée comme une contre-régulation ayant pour but de prévenir l'atrophie (Legerlotz and Smith 2008). La signification de telles variations pourraient également être liée à des modifications du phénotype musculaire observées au cours de l'immobilisation (Favier *et al.* 2008).

L'expression des MRF au cours de l'atrophie pourrait également être régulée par les protéines Id, inhibitrices de la différenciation (Favier *et al.* 2008). Ces protéines empêchent la liaison à l'ADN des MRF par interaction directe avec leur domaine bHLH et sont décrites pour bloquer la différenciation myogénique. Leur expression augmente dans les situations de fonte de la masse musculaire. Ainsi, la protéine Id2 est exprimée à des niveaux élevés dans le muscle de rats âgés sarcopéniques. Son expression est induite dans des modèles d'atrophie provoquée par dénervation, par tétrodontoxine ou par décharge musculaire (Alway *et al.* 2002a; Alway *et al.* 2002b; Alway *et al.* 2003). L'expression de la protéine Id1 est également induite en situation de décharge musculaire. De plus, la surexpression spécifiquement musculaire d'Id-1 dans des souris transgéniques induit une atrophie marquée (Gundersen and Merlie 1994). L'augmentation des protéines Id en situation d'immobilisation musculaire pourrait induire l'atrophie en bloquant l'activité transcriptionnelle des MRF sur les gènes muscle-spécifique, mais également en activant un processus apoptotique. La protéine Id2 est en effet décrite pour son implication dans l'apoptose de nombreux types cellulaires et l'atrophie musculaire s'accompagne d'une apoptose importante conduisant à la diminution du nombre de noyaux dans les fibres musculaires (Norton and Atherton 1998; Alway *et al.* 2003).

### **1.4.3. Implication des MRF dans la régulation du phénotype des fibres musculaires**

Le muscle squelettique est un assemblage hétérogène de fibres dont les capacités contractiles et métaboliques sont différentes (Figure 20). Le phénotype de ces fibres peut évoluer pour permettre au muscle de s'adapter à différents types d'activité. Il est déterminé par les propriétés biochimiques de la myosine exprimée par la fibre musculaire et par son contenu en enzymes métaboliques. Les fibres sont classifiées en fonction de l'isoforme de la myosine qu'elles expriment : MyHC I, IIa, IIb ou IIx. L'expression d'une isoforme de myosine détermine la vitesse de contraction mais est également corrélée aux propriétés

biochimiques de la fibre, déterminées par l'expression d'enzymes métaboliques spécifiques. Ainsi, les fibres de type I ont une faible vitesse de contraction mais possèdent des capacités oxydatives élevées leur conférant une bonne résistance à l'exercice, alors que les fibres IIB sont très rapides mais rapidement fatigables, leur métabolisme étant exclusivement glycolytique. Chez les rongeurs, les fibres IIA et IIX possèdent des capacités contractiles et métaboliques intermédiaires (Zierath and Hawley 2004).

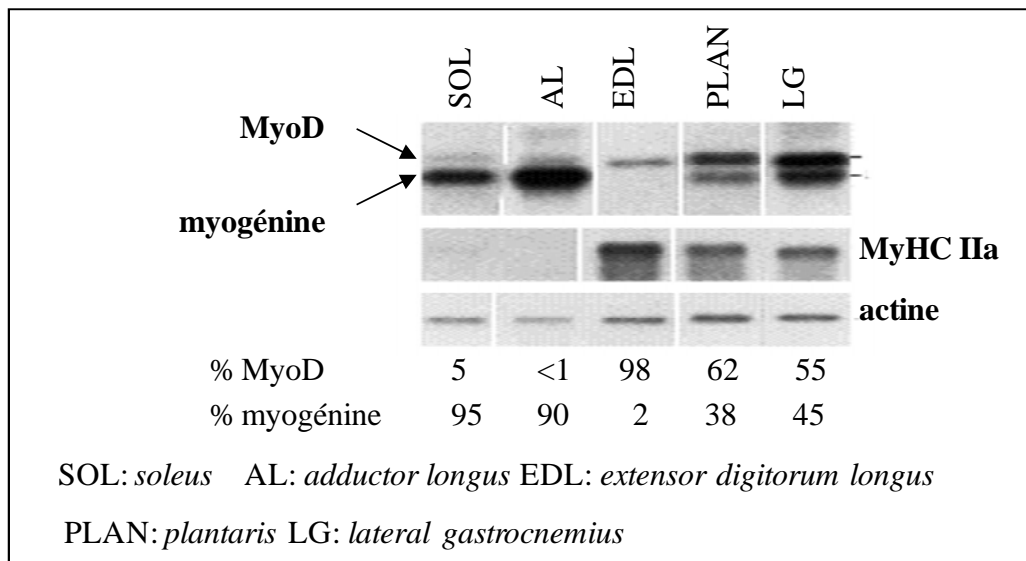


**Figure 20:** Les différents types de fibres musculaires

d'après Bassel-Duby et Olson, 2006 ; Graziotti et al. 2001

Ces dernières années, de nombreuses études ont démontré l'implication des MRF dans la détermination et la régulation du phénotype musculaire. Ainsi, le niveau de chacun des MRF diffère d'un type de fibre musculaire à l'autre et varie en accord avec le changement de phénotype musculaire (Figure 21). Chez le rat, MyoD est principalement exprimé dans les muscles rapides, comme le Tibialis Anterior, l'Extensor Digitorum Longus alors que la myogénine est fortement exprimée dans le Soleus, muscle lent oxydatif (Hughes *et al.* 1993; Hughes *et al.* 1997; Mozdziak *et al.* 1998; Mozdziak *et al.* 1999).

De plus, dans le Soleus le niveau de MyoD phosphorylé inactif est trois fois plus élevé que dans l'Extensor Digitorum Longus (Ekmark *et al.* 2007). La distribution de MyoD et de la myogénine au sein d'un même muscle n'est pas homogène, la myogénine s'accumulant dans les régions lentes alors que MyoD apparaît plus exprimé dans les régions rapides contenant plus de fibres IIX et IIB. De plus, la modification de la distribution des fibres lentes et rapides dans un muscle, due à une modification de l'innervation ou un traitement hormonal, provoque une altération similaire dans la distribution de MyoD et de la myogénine (Hughes *et al.* 1993).



**Figure 21: Répartition de l'expression de MyoD et de la myogénine en fonction du type de muscle squelettique**

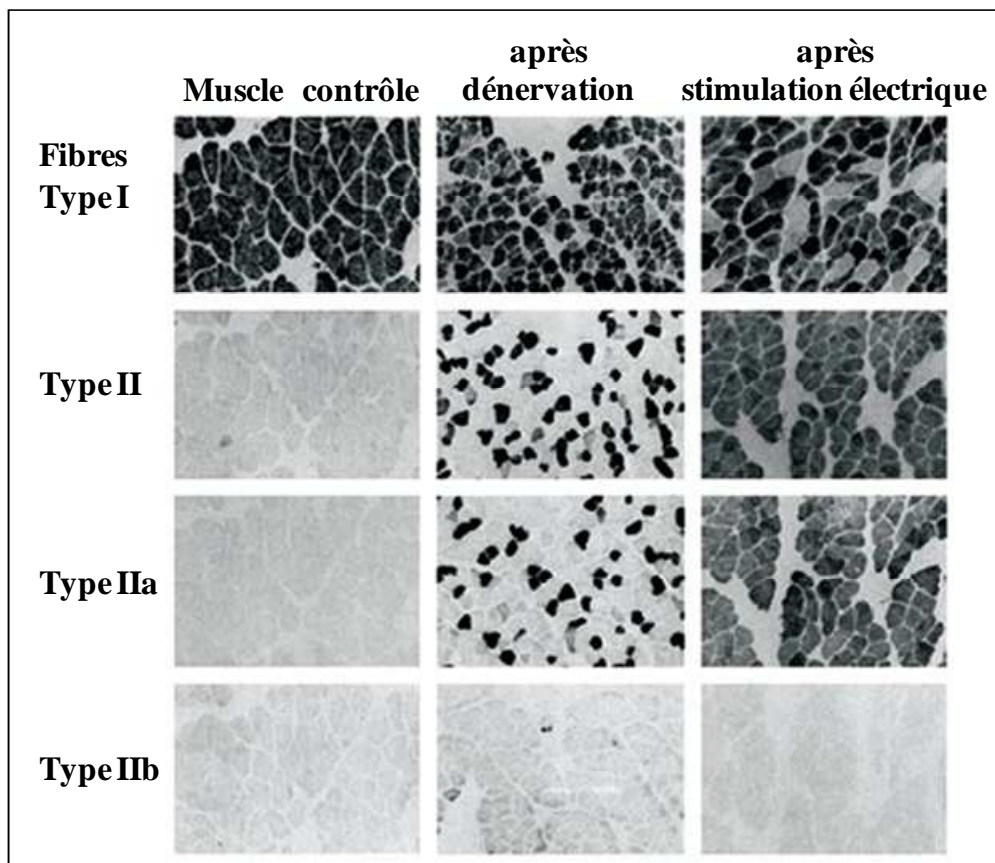
d'après Hughes *et al.* 1993

MyoD semble donc impliqué dans la détermination du phénotype musculaire rapide glycolytique alors que la myogénine est impliquée dans la détermination du phénotype musculaire lent oxydatif, contrôlant chacun l'expression des isoformes spécifiques de myosine.

Outre la régulation de l'expression de la myosine de type I, la myogénine régule également l'expression des enzymes impliquées dans le phénotype métabolique des fibres musculaires de type I. La surexpression de la myogénine dans le muscle de souris transgénique entraîne une hausse de l'activité des enzymes oxydatives, comme la succinate synthase, alors que l'activité des enzymes glycolytiques, comme la GADPDH ou la lactate déshydrogénase, diminue (Hughes *et al.* 1999; Ekmark *et al.* 2003).

L'expression de la myogénine est également liée à l'augmentation de la citrate synthase chez le rat entraîné en endurance (Siu *et al.* 2004). La myogénine participe donc spécifiquement à la transition du phénotype musculaire rapide vers un phénotype musculaire lent.

En plus d'une diminution de la taille des fibres musculaires, l'atrophie se caractérise par une transition du phénotype musculaire généralement du type lent vers le type rapide (Figure 22) (Bassel-Duby and Olson 2006; Harridge 2007).



**Figure 22: Transition du phénotype musculaire**

lent vers rapide après dénervation ;  
rapide vers lent après électrostimulation

d'après Schiaffino et Sandri, 2007

L'expression de MyoD, associée au phénotype musculaire rapide, augmente au cours d'expériences de dénervation ou de décharge musculaire, de façon parallèle à l'expression de la myosine IIx (Weis 1994; Loughna *et al.* 1996; Mozdziak *et al.* 1999; Walters *et al.* 2000a; Hyatt *et al.* 2003; Ishido *et al.* 2004a). Cependant la rapidité et l'amplitude de l'activation de MyoD au cours de l'atrophie semblent dépendre du type du muscle considéré, certains muscles rapides évoluant plutôt vers un phénotype lent suite à une dénervation (Voytik *et al.*

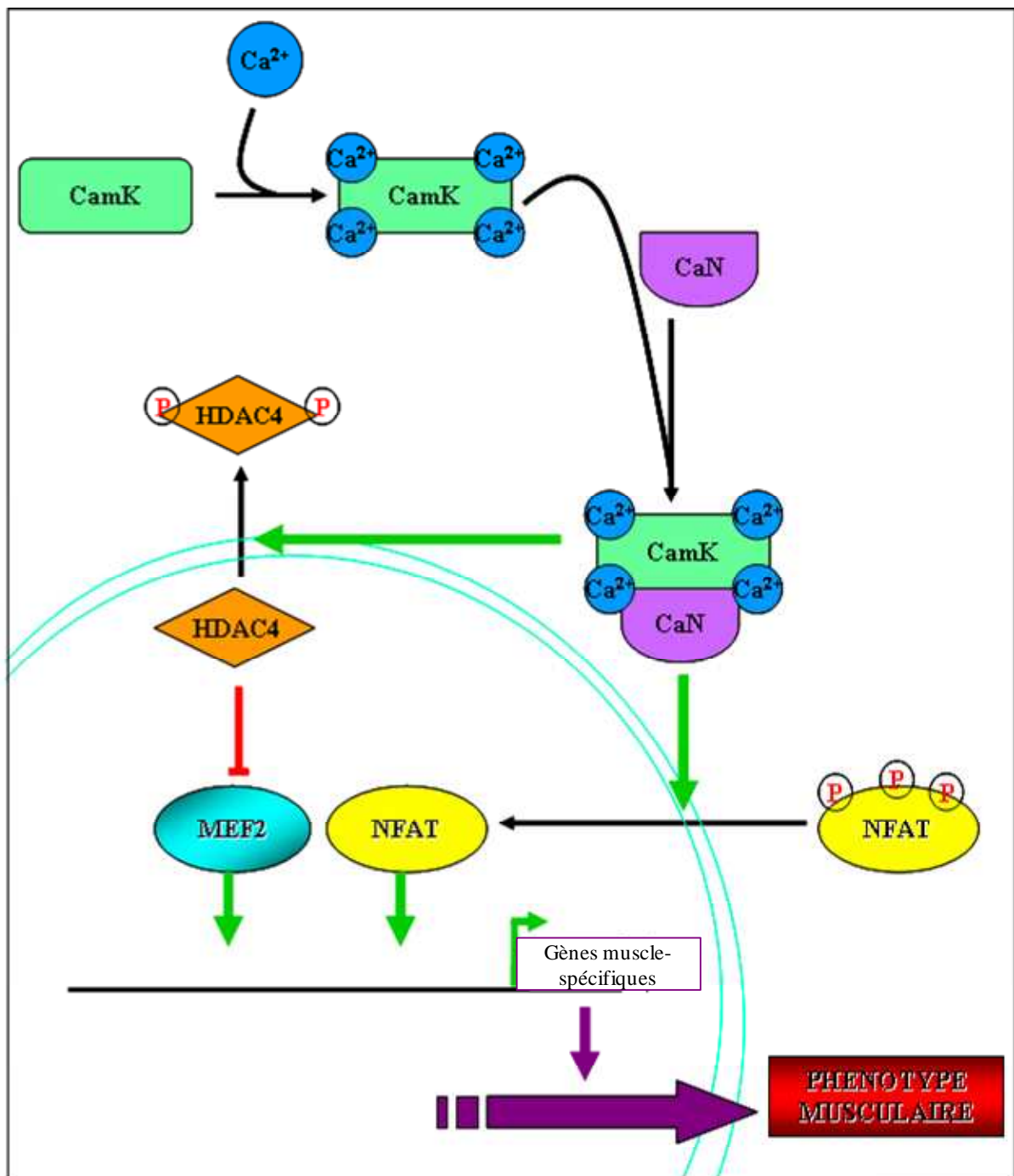
1993). D'autre part, le KO de *myod* dans des souris transgéniques entraîne comme attendu une transition de phénotype des muscles normalement de type rapide vers un type lent, mais, de façon surprenante, certains muscles lents, comme le Soleus, évoluent vers un phénotype rapide (Hughes *et al.* 1997; Seward *et al.* 2001). Le rôle de MyoD dans la régulation du phénotype musculaire n'apparaît donc pas aussi tranché que celui de la myogénine.

Le manque de spécificité de MRF4, fortement exprimé dans tout type de muscle squelettique, suggère que s'il semble ainsi indispensable à la fonction musculaire, ce facteur joue seulement un rôle mineur dans la détermination du phénotype musculaire (Hughes *et al.* 1997). Cependant, s'il ne montre pas de différence d'expression entre les différents types de muscles à l'échelle du muscle entier, MRF4 est préférentiellement exprimé dans les fibres lentes oxydatives au sein des muscles mixtes ou des muscles rapides et cette expression varie au cours d'une immobilisation musculaire (Walters *et al.* 2000b).

Comme le prouve les expériences de dénervation et autres expériences de stimulation électrique du muscle, l'activité électrique est essentielle à la détermination du phénotype musculaire (Bassel-Duby and Olson 2006). L'activité électrique favorise l'établissement d'un phénotype musculaire lent (Schiaffino *et al.* 2007). Ces effets sont transmis par le calcium, auquel sont sensibles plusieurs facteurs de transcription. En fait, le calcium active la voie des protéines kinases calmoduline-dépendantes, CaMK, qui elles-mêmes activent le calcineurine (Chin *et al.* 1998; Naya *et al.* 2000; Schiaffino *et al.* 2007). Deux facteurs de transcription agissent en aval de la calcineurine, NFAT et MEF2 (Figure 23) (Friday and Pavlath 2001; Friday *et al.* 2003). Ces deux facteurs régulent l'expression de gènes spécifiques des fibres musculaires lentes oxydatives. De plus la calcineurine stimulerait l'expression de la myogénine.

Ainsi, plus que dans la régulation de la masse musculaire en elle-même, les MRF apparaissent fondamentalement impliqués dans le maintien du phénotype contractile et métabolique des fibres musculaires et jouent un rôle important dans la capacité du muscle squelettique à modifier ses propres propriétés physiologiques en réponse au stress auquel il est soumis.





**Figure 23: Régulation du phénotype musculaire en réponse au calcium**  
d'après Bassel-Duby et Olson, 2006



#### 1.4.4. Autres acteurs du contrôle de la masse musculaire

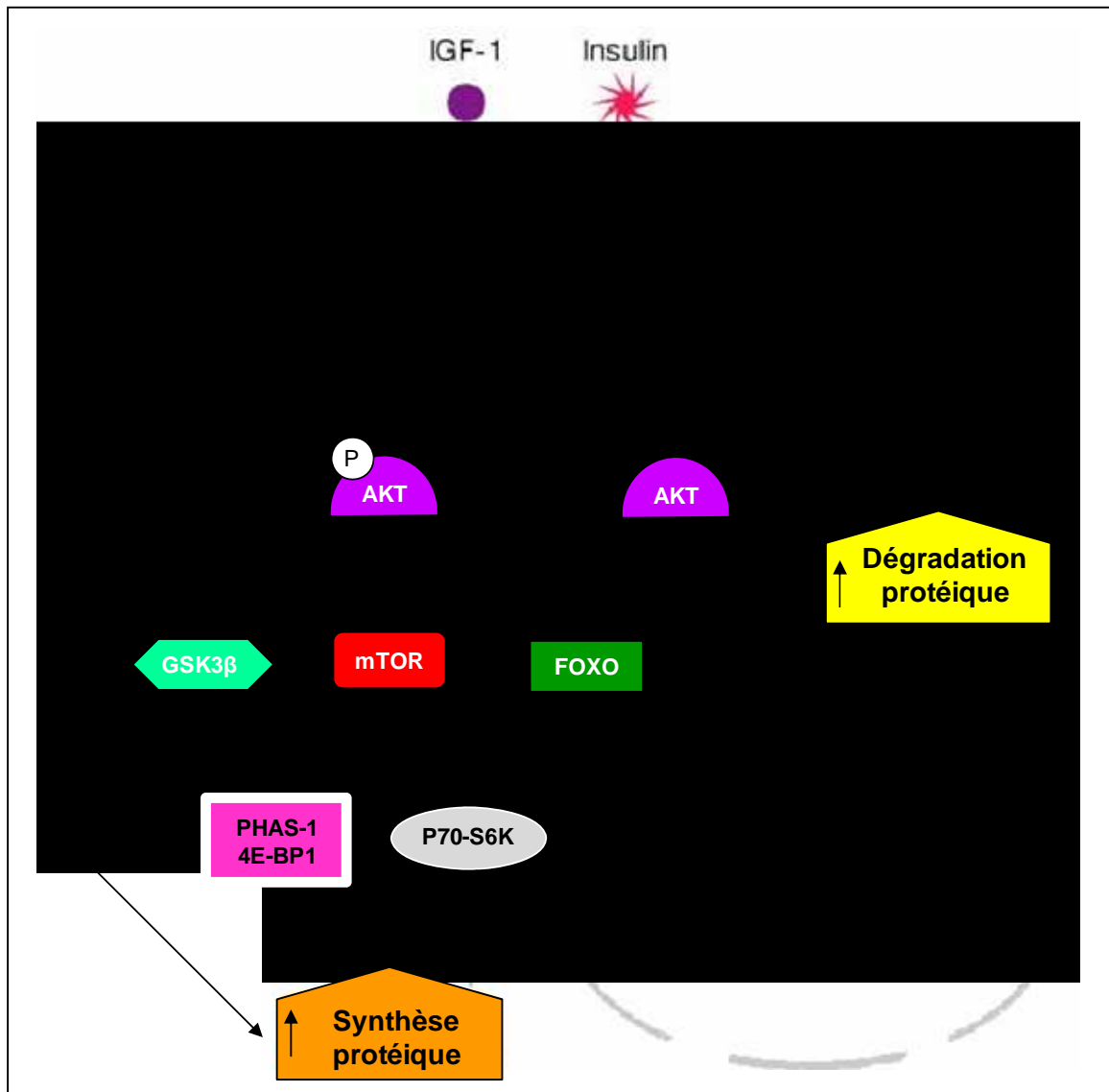
Si les MRF sont impliqués dans le contrôle de la taille et du phénotype des fibres musculaires en tant que régulateurs transcriptionnels des gènes muscle-spécifiques et notamment des protéines myofibrillaires, d'autres voies sont fondamentales dans la régulation de la masse musculaire, contrôlant l'équilibre entre synthèse et dégradation protéique (Sandri 2008).

Dans ce contexte, la voie PI3Kinase/AKT joue un rôle central, AKT pouvant à la fois stimuler la synthèse protéique en activant la traduction et prévenir la dégradation protéique en inhibant l'expression des acteurs du système ubiquitine protéasome, UPS (Figure 24) (Frost and Lang 2007). La voie PI3K/AKT favorise donc le développement de l'hypertrophie musculaire et est activée par différents facteurs anaboliques tels que les facteurs de croissance, l'insuline ainsi que l'activité musculaire (Rommel *et al.* 2001; Sakamoto *et al.* 2002; Vary and Lynch 2006). Parmi ces facteurs, le plus puissant inducteur de la voie PI3K/AKT est le facteur de croissance IGF-1, dont la surexpression dans le muscle squelettique est suffisante pour induire une hypertrophie massive (Coleman *et al.* 1995; Musaro *et al.* 1999; Musaro *et al.* 2001). La PI3K, activée en réponse à la fixation d'IGF-1 sur son récepteur ou le récepteur à l'insuline, phosphoryle le phospholipide membranaire PIP2 en PIP3 et permet ainsi le recrutement à la membrane et l'activation d'AKT.

Les deux effecteurs principaux des effets hypertrophiques de la voie PI3K/AKT sont la glycogène synthase kinase 3 GSK3 $\beta$  et la kinase mTOR qui toutes deux contrôlent la synthèse protéique (Figure 24).

La GSK3 $\beta$  bloque l'action du facteur d'initiation de la traduction eIF2B et est inhibée par AKT, qui active ainsi la synthèse protéique. L'expression d'un dominant négatif de GSK3 $\beta$  induit une hypertrophie marquée (Rommel *et al.* 2001).

La kinase mTOR stimule la traduction des protéines, d'une part en inhibant le répresseur du facteur d'initiation eIF4E, 4E-BP1, et d'autre part en activant la kinase des protéines ribosomales S6, la P70S6K (Bodine *et al.* 2001b).



**Figure 24:** Implication de la voie PI3Kinase-AKT dans la régulation de la masse musculaire d'après Bassel-Duby et Olson, 2006

En plus de contrôler la traduction, AKT bloque la dégradation des protéines musculaires par le système ubiquitine protéasome. L'élévation de l'expression des composants du système UPS, dont la sous-unité 26S du protéasome lui-même, ainsi que la prévention de l'atrophie musculaire par l'utilisation d'inhibiteurs du protéasome ont montré le rôle essentiel du système UPS dans l'atrophie musculaire (Murton *et al.* 2008). L'étude du profil génique de différents modèles d'atrophie met en évidence deux gènes codant pour les ubiquitine ligases MAFbx/Atrogin-1 et MuRF-1, fortement exprimés dans les muscles atrophiques (Figure 24) (Bodine *et al.* 2001a; Jagoe *et al.* 2002; Stevenson *et al.* 2003; Lecker *et al.* 2004).

De plus, le KO de ces deux atrogènes rend les souris transgéniques résistantes à l'atrophie musculaire induite par dénervation. MuRF1 et Atrogine-1 apparaissent comme responsables de la dégradation des protéines myofibrillaires par le système UPS. Quelques cibles directes des atrogènes sont décrites, dont la troponine I, la titine et MyoD. L'expression de MuRF-1 et Atrogine-1 est régulée par AKT ; leur expression en situation d'atrophie musculaire étant inhibée par un traitement à l'IGF-1 ou une surexpression d'AKT (Stitt *et al.* 2004; Lang *et al.* 2007). Le mécanisme par lequel AKT contrôle l'expression des atrogènes implique le facteur de transcription FOXO (Sandri *et al.* 2004). *In vivo*, FOXO3 suffit à induire l'expression de MuRF-1 et Atrogine-1 et provoque l'atrophie lorsqu'il est transfecté dans un muscle squelettique. AKT inhibe l'activité de FOXO par phosphorylation, provoquant son exclusion du noyau et l'inhibition de l'expression des atrogènes. AKT inhibe ainsi la dégradation des protéines myofibrillaires.

Entre ces différents mécanismes de contrôle de la masse musculaire, régulant la synthèse protéique aux niveaux transcriptionnel, par les MRF, traductionnel, par la voie PI3K/AKT et post-traductionnel, par les atrogènes, de nombreuses boucles de rétrocontrôle et de contre-régulation se mettent en place. En conséquence, l'altération d'une de ces voies de régulation peut entraîner une modification de l'activité des autres voies impliquées dans cet équilibre régulationnel.

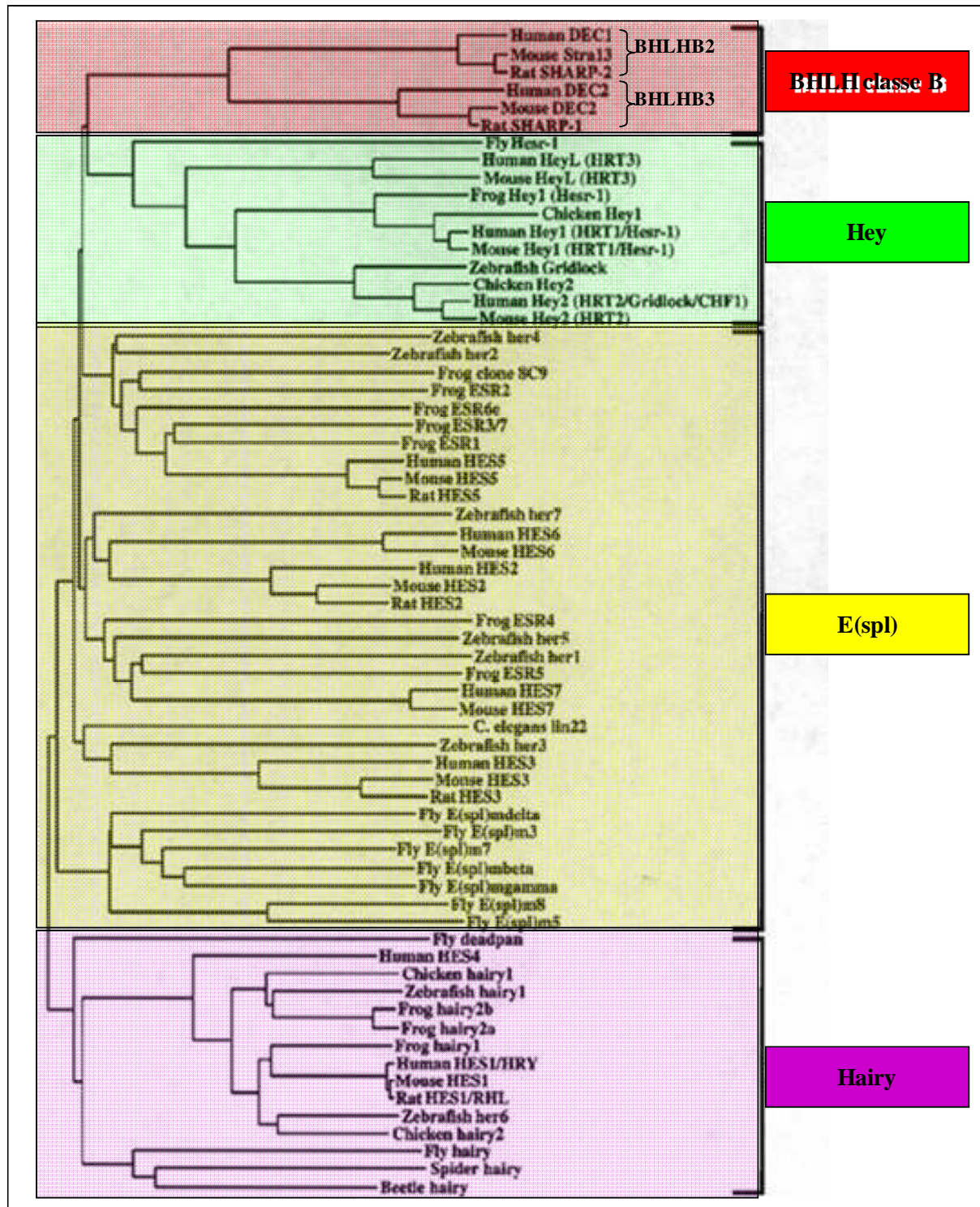
## 2. Les répresseurs transcriptionnels BHLHB2 et BHLHB3

La détermination et le maintien d'un phénotype cellulaire sont le résultat de l'activation transcriptionnelle de gènes spécifiques permettant l'établissement des caractéristiques propres à un type cellulaire donné. Ce processus nécessite également de maintenir silencieux les gènes spécifiques d'autres lignages cellulaires.

La majorité des membres de la super-famille des bHLH sont considérés comme des activateurs transcriptionnels. Cependant, deux familles de facteurs bHLH agissent comme répresseurs transcriptionnels (Massari and Murre 2000). La première, dont nous avons vu le rôle au cours du développement musculaire comme répresseurs des MRF, est la famille des protéines Id. Ces protéines forment des dimères via leur domaine HLH avec d'autres bHLH, mais ne possédant pas de domaine basique, elles ne peuvent se fixer à l'ADN et séquestrent leurs cibles dans le noyau (Yokota and Mori 2002). Une seconde famille de répresseurs transcriptionnelles bHLH est décrite, il s'agit des protéines bHLH-Orange ou bHLH-O (Davis and Turner 2001). Ces protéines sont regroupées au sein de la même famille de part leur identité de séquence au niveau du domaine bHLH. En outre, elles possèdent toutes un domaine additionnel conservé caractéristique de cette famille de protéines : le domaine Orange. D'abord décrites chez la drosophile, les protéines bHLH-O Hairy et Enhancer of split ont des homologues chez les mammifères, le poulet, la grenouille ou encore le poisson zèbre. Ces facteurs constituent le groupe E de la super-famille bHLH selon la classification phylogénétique proposée par Ledent (Ledent *et al.* 2002). Ce groupe se divise en quatre sous-classes : les HES, comprenant les protéines Hairy et Enhancer of Split E(spl), les Hey pour Hairy/E (spl)-related with YRPW motif, Helt et enfin les protéines bHLH-containing protein class B bHLHB (Figure 25). Douze bHLH-O sont répertoriés chez l'homme, dont deux protéines bHLHB : BHLHB2 et BHLHB3.

Les répresseurs transcriptionnels BHLHB2 et BHLHB3 ont été clonés indépendamment par plusieurs groupes, donnant lieu à plusieurs appellations dans la littérature : BHLHB2 est désigné chez la souris par Stra13, pour Stimulated with retinoic acid, chez le rat par SHARP-2, pour enhancer of Split and Hairy-related protein 2, et chez l'homme par DEC1, pour Differentially Expressed in Chondrocytes (Boudjelal *et al.* 1997; Dear *et al.* 1997; Rossner *et al.* 1997; Shen *et al.* 1997); BHLHB3 est désigné chez la souris comme

mSharp-1, chez le rat par SHARP-1 et chez l'homme par DEC2 (Rossner *et al.* 1997; Fujimoto *et al.* 2001; Azmi and Taneja 2002). Nous conserverons tout au long de ce chapitre, l'appellation BHLHB2 et BHLHB3, pour bHLH-containing proteins class B.



**Figure 25:** Arbres phylogénétiques des protéines de la famille bHLH-O

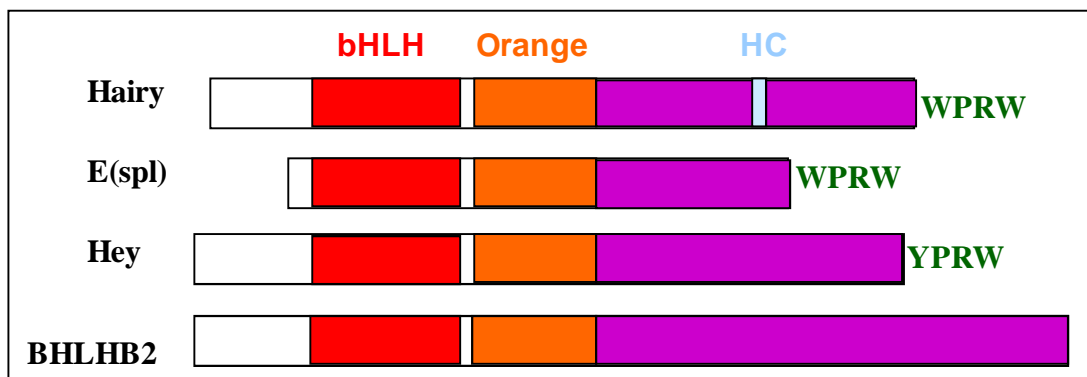
d'après Davis et Turner, 2001

## 2.1. BHLHB2 et BHLHB3 : Structure et Fonction

### 2.1.1. Structure protéique

#### a) BHLHB2 et BHLH3 : une nouvelle famille de protéines

L'analyse phylogénétique indique que les protéines BHLHB2 et B3 constituent à elles seules un groupe à part entière de protéines bHLH-O. Comme tous les facteurs de la famille bHLH-O, BHLHB2 et BHLHB3 possèdent un domaine bHLH en N-terminale et un domaine Orange en position centrale. Pourtant, l'alignement de leur séquence génomique et l'étude de leur domaine protéique ne révèle qu'une très faible homologie entre ces deux facteurs et les autres membres de la famille bHLH-O, atteignant à peine 40 % sur le domaine bHLH, le plus conservé ( Figure 26) (Dawson *et al.* 1995; Kokubo *et al.* 1999).



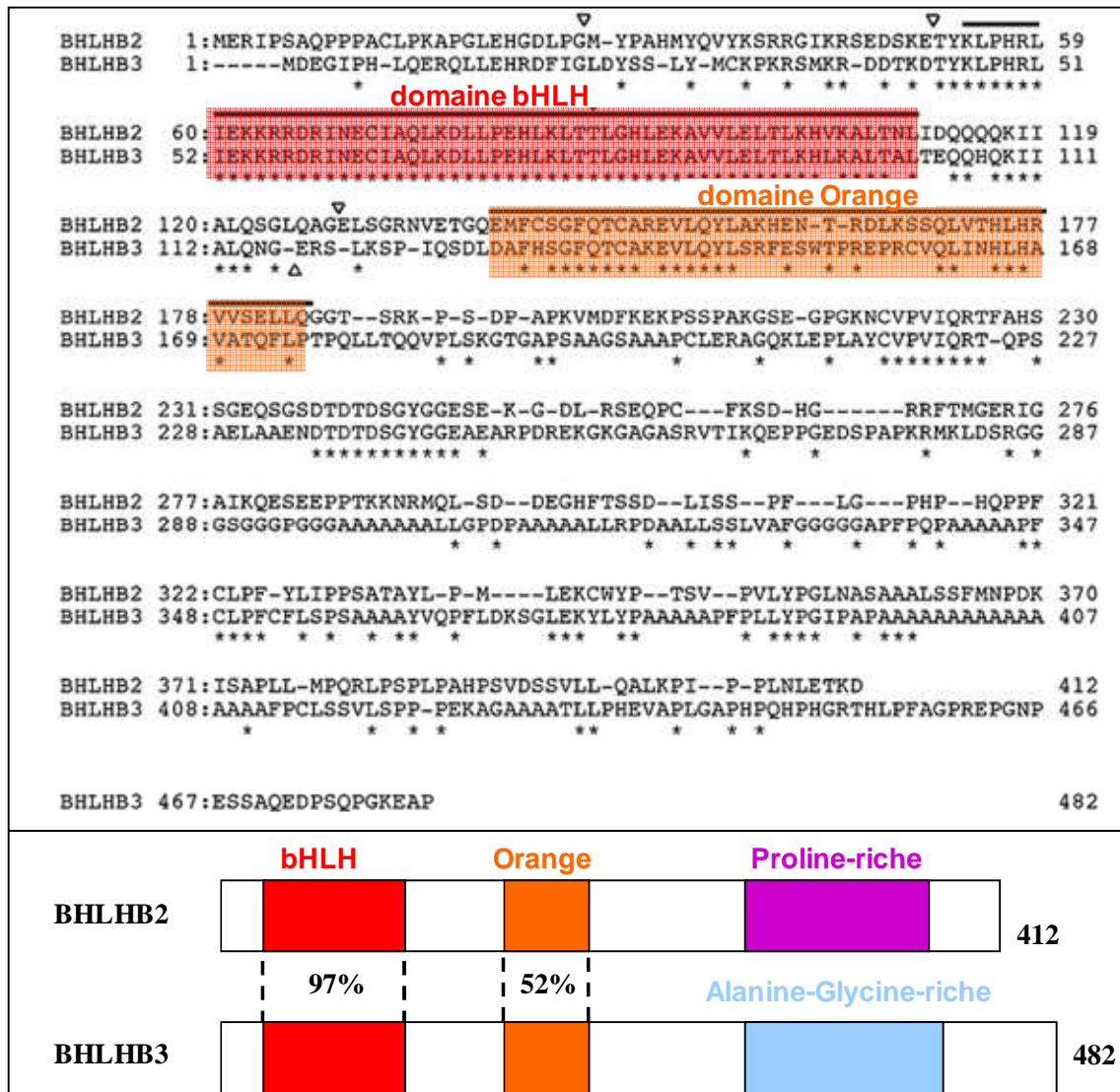
**Figure 26:** Structure protéique schématique des protéines de la famille bHLH-O

d'après Davis et Turner, 2001

De plus, les protéines bHLH-O possèdent un résidu proline conservé au sein de leur domaine bHLH ; sur BHLHB2 et BHLHB3 cet acide aminé proline est décalé de deux résidus en N-terminale (Fujimoto *et al.* 2001). Enfin, autre différence structurale majeure : à l'inverse des protéines Hairy/HES/E(spl), BHLHB2 et B3 ne possèdent pas de motif térapeptidique WRPW en C-terminale (Fisher *et al.* 1996). Grâce à cette séquence, Hairy/HES/E(spl) recrute le corépresseur Groucho, responsable en grande partie de l'activité biologique de ces facteurs notamment au cours de la détermination et différenciation cellulaire (Paroush *et al.* 1994). L'absence de ce térapeptide à l'extrémité C-terminale de BHLHB2 et BHLHB3 implique la mise en œuvre par ces facteurs de nouveaux mécanismes de répression transcriptionnelle.



## b) Différence et homologie entre BHLHB2 et BHLHB3



**Figure 27 : Homologie entre les facteurs BHLHB2 et BHLHB3**

d'après Yamada et Myamoto, 2005

BHLHB2 et BHLHB3 sont homologues à 42%. Leurs domaines bHLH possèdent plus de 97% d'acides aminés identiques (Fujimoto *et al.* 2001). Une telle homologie dans le domaine de liaison à l'ADN suppose que ces deux protéines peuvent réguler l'expression de gènes cibles communs. Cette redondance fonctionnelle expliquerait pourquoi les souris KO *BHLHB2* ne présentent pas un phénotype différent des souris sauvages (Sun *et al.* 2001). Cependant, BHLHB2 et BHLHB3 pourraient ne pas avoir la même activité biologique sur certains gènes cibles et dans certains types cellulaires car leurs régions C-terminales présentent des différences structurales importantes. Ainsi leur domaine Orange n'est que moyennement conservé, avec seulement 52% d'homologie. De plus leurs extrémités C-

terminales sont différentes. Constituée d'une région riche en proline sur BHLHB2, cette extrémité est une région riche en alanine et glycine sur BHLHB3 (Figure 27).

### c) Le domaine Orange

Le domaine Orange est un domaine protéique d'environ 35 acides aminés, constitué de deux hélices, désignées HIII/HIV. La région située entre le domaine bHLH et le domaine Orange est de longueur variable et très peu conservée au sein des sous-classes de bHLH-O. Ce domaine n'a jamais été retrouvé dans des protéines non-bHLH mais sa fonction n'a pas encore été clairement élucidée.

Chez la drosophile, le gène sex-lethal est activé par le facteur bHLH Scute. Cette activation est inhibée par Hairy mais non par E(spl). Le remplacement du domaine Orange de E(spl) par celui de Hairy lui confère les mêmes capacités répressives (Dawson *et al.* 1995). Par ailleurs, la délétion du domaine Orange de HES1 supprime ses capacités d'inhibition (Castella *et al.* 2000). Le domaine Orange confère donc aux protéines bHLH-O leur spécificité d'action et leurs capacités répressives.

La comparaison avec les autres membres bHLH possédant un domaine additionnel suggère que le domaine Orange pourrait jouer un rôle dans la dimérisation des bHLH-O avec d'autres facteurs. Deux autres groupes de bHLH possèdent un domaine additionnel situé en C-terminale du domaine bHLH, les bHLH-LZ et les bHLH-PAS. Au sein de ces deux types protéiques, le domaine additionnel favorise la dimérisation et détermine sa spécificité (Jones 2004). Il est possible également que les deux hélices supplémentaires du domaine Orange aient un effet stabilisateur sur le dimère formé, en augmentant les possibilités d'interaction entre les deux monomères. Le domaine Orange est en effet le domaine d'interaction entre les protéines Helt et HES5 (Nakatani *et al.* 2004).

## 2.1.2. Bases moléculaires de la répression transcriptionnelle par BHLHB2/B3

### a) Liaison aux motifs E-Box

Les facteurs appartenant à la super-famille des bHLH agissent sous forme d'homo- ou hétéro-dimères se liant à l'ADN au niveau de motifs E-Box consensus. Comme les autres



protéines, BHLHB2 et BHLHB3 forment, via leur domaine HLH, des homodimères capables de réprimer l'activité de leurs gènes cibles.

Les protéines bHLH-O, à l'inverse des protéines Id, autres répresseurs transcriptionnels de la famille bHLH, peuvent se lier à l'ADN grâce à leur domaine basique en amont du domaine HLH. BHLHB2 et BHLHB3 sont tout deux capables de se fixer à l'ADN au niveau de motifs E-Box, *in vitro* comme *in vivo* (Boudjelal *et al.* 1997 ; Azmi *et al.* 2003). BHLHB2 se lie avec une haute affinité au motif E-Box spécifique de la classe bHLH-B, CACGTG mais, *in vitro*, reconnaît également les motifs CACGTN, CATGTG et CACGCG, avec une affinité moindre (St-Pierre *et al.* 2002; Zawel *et al.* 2002). L'expression des gènes contenant des motifs E-box de classe B est spécifiquement réprimée par BHLHB2 et BHLHB3.

BHLHB2 et BHLHB3 peuvent réprimer l'expression de leurs gènes cibles en entrant en compétition avec des facteurs de transcription pour la liaison aux E-Box. La délétion du domaine basique de BHLHB2 et BHLHB3 réduit fortement leur activité répressive sur les promoteurs porteurs de E-Box (Li *et al.* 2003; Li *et al.* 2004). Ces données montrent que la liaison à l'ADN est nécessaire à la répression par BHLHB2 et BHLHB3. La délétion de leur extrémité C-terminale induit également une diminution de la répression transcriptionnelle de promoteur porteur d'E-Box. Par contre, l'introduction de mutations au sein du domaine Orange semble sans effet. Deux régions sont donc indispensables à l'activité des répresseurs transcriptionnels BHLHB2 et BHLHB3 : leur domaine basique et leur extrémité C-terminale.

#### **b) Recrutement de co-répresseurs**

Le mécanisme de répression classique mis en œuvre par les protéines de la famille bHLH-O est le recrutement de co-répresseurs de type histone-déacétylases. Les protéines HES et Hey possèdent à leur extrémité C-terminale un motif térapeptidique, respectivement WRPW ou YRPW, qui leur permet de recruter le corépresseur transcriptionnel Groucho/TLE, lui-même capable de recruter des HDAC (Figure 28).

Les protéines BHLHB2 et BHLHB3 ne possèdent aucune séquence similaire aux motifs WRPW ou YRPW. Cependant, elles peuvent réprimer leurs gènes cibles par un mécanisme HDAC-dépendant. En effet, la répression transcriptionnelle de BHLHB2, sur sa propre expression, sur celle de *BHLHB3* et sur celle du gène codant le récepteur muscarinique

à l'acétylcholine, est inhibée par l'utilisation de trichostatine A, TSA, un puissant inhibiteur des HDAC. La TSA inhibe en fait l'activité répressive liée à l'extrémité C-terminale de ces deux facteurs. De fait, BHLHB2 interagit avec les corépresseurs HDAC1, NCoR et mSin3A grâce à deux hélices  $\alpha$  située au niveau de son extrémité C-terminale (Sun and Taneja 2000). BHLHB3 interagit également avec HDAC1 par son extrémité C-terminale (Figure 28) (Garriga-Canut *et al.* 2001; Fujimoto *et al.* 2007).

### c) Autres mécanismes : interactions protéiques

BHLHB2 et BHLHB3 peuvent également réprimer la transcription de leurs gènes cibles par des mécanismes indépendants du recrutement de co-répresseurs.

Ainsi, le traitement à la TSA est sans effet sur l'inhibition de l'expression du gène *c-myc* par BHLHB2. Le mécanisme par lequel BHLHB2 réprime l'expression de *c-myc* implique la liaison de BHLHB2 avec TFIIB (Figure 28). BHLHB2 peut ainsi réprimer l'expression génique par interaction directe avec la machinerie basale de transcription et notamment les facteurs TFIIB et TBP (Sun and Taneja 2000).

La liaison à l'ADN n'est pas absolument nécessaire à l'activité répressive de BHLHB2 et BHLHB3. Grâce à leur domaine HLH, ces deux répresseurs transcriptionnels peuvent interagir directement avec d'autres facteurs bHLH pour former des hétérodimères incapables de se lier à l'ADN (Figure 28). BHLHB3 peut se lier directement à MyoD ou à ses partenaire E-47 et E-12 et ainsi bloquer leur activité transcriptionnelle en les séquestrant (Azmi *et al.* 2003 ; Azmi *et al.* 2004 ; Fujimoto *et al.* 2007)

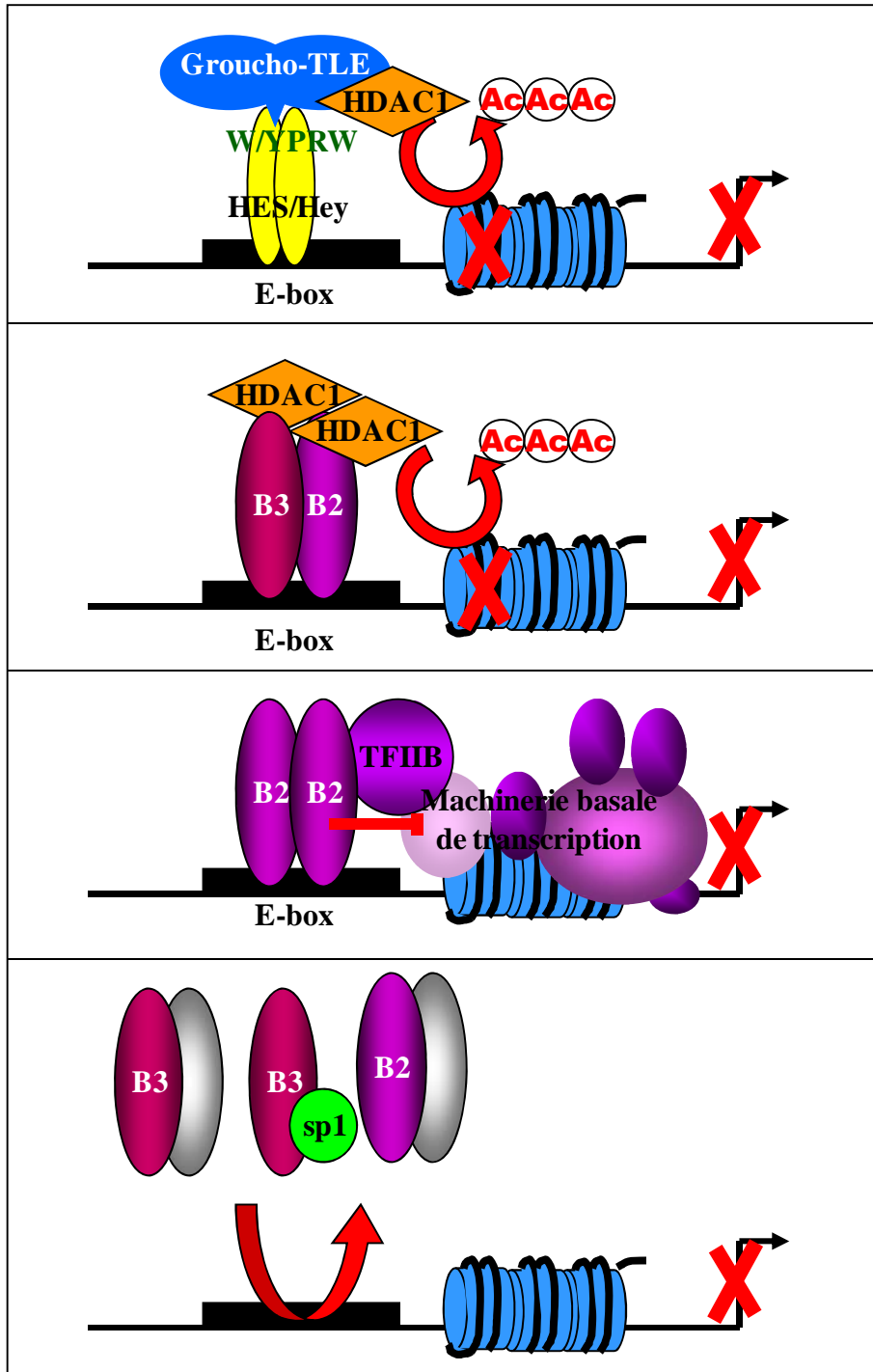
L'interaction entre BHLHB2-B3 et les facteurs bHLH ne fait pas systématiquement intervenir le domaine HLH. Ainsi, BHLHB2 peut se lier au domaine basique de l'activateur transcriptionnel USF-2 via son extrémité C-terminale et ainsi empêcher sa liaison à l'ADN (Dhar and Taneja 2001). Autre exemple, le domaine basique de BHLHB2 interagit avec la région C-terminale de B/MAL1, incluant son domaine PAS ; BHLHB2 réprime ainsi l'expression des gènes cibles de B/MAL1, régulateur du cycle circadien. La région N-terminale de BHLHB3 interagit également avec B/MAL1 pour réprimer son activité (Honma *et al.* 2002; Sato *et al.* 2004).

Enfin, BHLHB2 et BHLHB3 peuvent se lier à des protéines non-bHLH. Ainsi, BHLHB3 inhibe l'expression de *BHLHB2* en se liant à l'activateur transcriptionnel Sp1, bloquant ainsi la reconnaissance de ces sites consensus de liaison à l'ADN les boîtes GC (Figure 28) (Azmi *et al.* 2003). De son côté, BHLHB2 interagit avec la protéine de transfert MSP58 (microsphérule 58). Le complexe BHLHB2 et MSP58 réprime de façon synergique l'expression génique. Cette interaction nécessite la phosphorylation de 2 résidus sérines et thréonine de BHLHB2. Elle a pour conséquence de stabiliser les deux protéines en empêchant leur dégradation par le système UPS (Ivanova *et al.* 2005b). Par ailleurs, le domaine HLH et la région C-terminale de BHLHB2 peuvent interagir avec le facteur de transcription STAT3. BHLHB2 interagit préférentiellement avec la forme phosphorylée active de STAT3 et stimule ainsi la transcription de gènes porteurs d'élément de liaison à STAT (Ivanova *et al.* 2004). Sous certaines conditions, BHLHB2 pourrait donc se comporter comme activateur transcriptionnel.

Les mécanismes de répression transcriptionnelle mis en œuvre par BHLHB2 et BHLHB3 sont donc multiples et interviennent à différents niveaux (Figure 28) :

- en interagissant avec les activateurs transcriptionnels et en empêchant leur liaison à l'ADN ou en bloquant leur activité,
- en entrant en compétition avec les activateurs transcriptionnelles pour la liaison à l'ADN au niveau des E-Box,
- en recrutant des co-répresseurs et notamment des histone-déacétylases au niveau des régions promotrices
- et enfin en interagissant directement avec la machinerie basale de transcription.

Ainsi, l'activité biologique de BHLHB2-B3 est régulée non seulement par les mécanismes impliquant la liaison à l'ADN mais aussi en grande partie par les interactions protéines-protéines. Ces répresseurs transcriptionnels étant capables de former des dimères avec de nombreux facteurs appartenant ou non à la super-famille bHLH, ils pourraient être impliqués *in vivo* dans les multiples processus physiologiques régulés par les bHLH.



**Figure 28:** Mécanismes de répression transcriptionnelle par BHLHB2 et BHLHB3

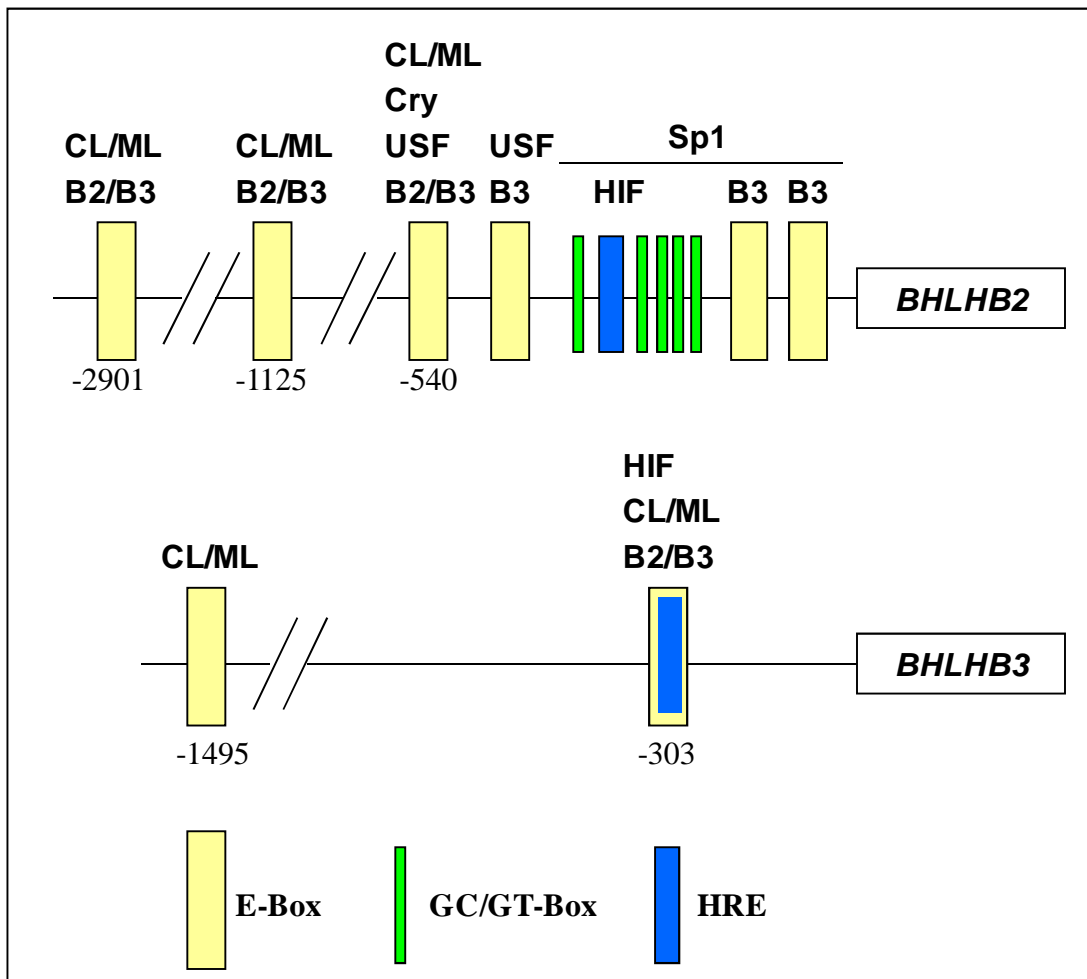
### 2.1.3. Structure et régulation de l'expression des gènes *BHLHB2* et *BHLHB3*

Chez l'homme, les gènes *BHLHB2* et *BHLHB3* sont localisés respectivement au niveau du chromosome 3p26 et 12p11 (Sun and Taneja 2000; Fujimoto *et al.* 2001). Ils sont constitués de 5 exons et 4 introns sur 6Kb de longueur pour *BHLHB2* et 5Kb pour *BHLHB3* (Teramoto *et al.* 2001; Hirano *et al.* 2004).

De part son expression ubiquitaire et l'absence de TATA-Box sur son promoteur, le gène *BHLHB2* a été longtemps considéré comme un gène constitutif ou « gène de ménage ». Son promoteur présente plusieurs sites d'initiation de la transcription. Sa transcription basale est contrôlée par de multiples motifs E-Box et GC/GT-Box. Son expression basale est soutenue, via ces GC/GT box, par Sp1, dont la surexpression stimule l'activité promotrice de *BHLHB2* (Azmi *et al.* 2003). L'activateur transcriptionnel USF peut aussi se lier au promoteur de *BHLHB2* (Hirano *et al.* 2004). Le complexe régulateur du cycle circadien CLOCK/BMAL1 se fixe au niveau des E-Box de *BHLHB2* pour réguler son expression cérébrale (Figure 29) (Grechez-Cassiau *et al.* 2004; Kawamoto *et al.* 2004).

L'expression du gène *BHLHB3* est plus restreinte que celle de *BHLHB2*. *BHLHB3* s'exprime de manière tissu-spécifique et à des niveaux élevés dans le cœur, le cerveau et le muscle squelettique, mais aussi dans le poumon, le pancréas, et le rein, à plus faible niveau (Rossner *et al.* 1997; Fujimoto *et al.* 2001). Les seuls éléments régulateurs décrits sur le promoteur de *BHLHB3* sont des motifs E-Box. Sur ces motifs, se fixe le complexe Clock/BMAL1 qui active la transcription de *BHLHB3* (Figure 29) (Miyazaki *et al.* 2002; Li *et al.* 2003; Hamaguchi *et al.* 2004).

Un élément fonctionnel de réponse à l'hypoxie, HRE, a été identifié sur le promoteur de *BHLHB2*. Un élément HRE est également présent sur le promoteur de *BHLHB3* (Figure 29). L'expression de *BHLHB2* et *BHLHB3* est en effet induite en condition d'hypoxie par le facteur HIF1, notamment au cours du développement tumoral.



**Figure 29:** Représentation schématique du promoteur de *BHLHB2* et *BHLHB3*

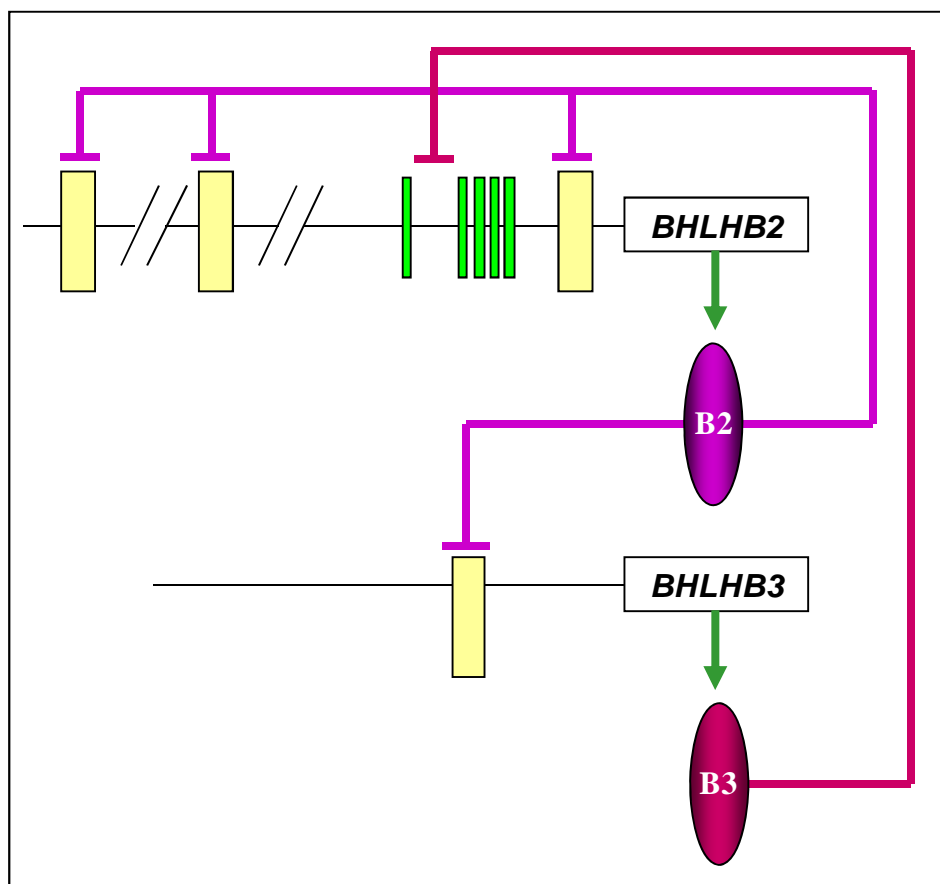
d'après Yamada et Miyamoto, 2005

#### 2.1.4. Régulation réciproque et autorégulation

*BHLHB2* et *BHLHB3* régulent leur propre expression de façon réciproque, *BHLHB3* inhibant l'expression de *BHLHB2* et *BHLHB2* inhibant sa propre expression et celle de *BHLHB3* (Figure 30).

*BHLHB2* inhibe sa propre expression, créant ainsi une boucle d'auto-rétrocontrôle négatif. Nous avons vu que *BHLHB2* pouvait se lier aux E-Box de classe B CACGTG, or le promoteur de *BHLHB2* contient 3 E-Box similaires en -261, -1125 et -2901. La répression par *BHLHB2* de son propre promoteur est sensible à la TSA. En effet, *BHLHB2* réprime la transcription de son propre gène en se liant aux motifs E-Box puis en recrutant les co-répresseurs HDAC1 et Sin3A (Sun and Taneja 2000; St-Pierre *et al.* 2002; Kawamoto *et al.* 2004).

*BHLHB2* est également la cible de *BHLHB3* qui réprime son expression par trois mécanismes différents. Tout d'abord, *BHLHB3* réprime l'activation transcriptionnelle de *BHLHB2* en se liant aux motifs E-Box présents sur son promoteur (Kawamoto *et al.* 2004). Cette répression est insensible à la TSA et ne fait donc pas intervenir de co-répresseurs type HDAC. Cependant la répression de *BHLHB2* par *BHLHB3* n'est pas totalement dépendante des E-Box, leur mutation ne levant pas la répression. *BHLHB3* est également capable d'interagir directement avec des activateurs transcriptionnels via son domaine HLH et de bloquer leur liaison à l'ADN, et notamment MyoD et E-47, régulateurs positifs du promoteur *BHLHB2* (Azmi *et al.* 2003). Enfin, *BHLHB3* réprime l'activation transcriptionnelle de *BHLHB2* en interagissant avec le facteur Sp1. Le promoteur de *BHLHB2* étant dépourvu de TATA-Box, son activité promotrice basale est entièrement dépendante de motifs riches en GC, sur lesquels se lie Sp1. En se liant à Sp1, *BHLHB3* n'empêche pas sa liaison à l'ADN mais bloque son activité, et inhibe ainsi l'expression de *BHLHB2*.



**Figure 30 : Autorégulation et régulation réciproque de l'expression de *BHLHB2* et *BHLHB3***

De façon réciproque, *BHLHB3* est réprimé par BHLHB2. Effectivement, la surexpression de BHLHB2 induit une diminution du niveau d'ARNm de BHLHB3, et inversement, l'expression de BHLHB3 est accrue dans le foie des souris transgéniques déficientes en BHLHB2 (Li *et al.* 2003; Grechez-Cassiau *et al.* 2004). La répression de *BHLHB3* par BHLHB2 implique la liaison de BHLHB2 au promoteur de *BHLHB3* via des motifs E-Box. En effet, la délétion du domaine basique de liaison à l'ADN de BHLHB2 lève l'inhibition de l'activité promotrice de *BHLHB3*. Le promoteur de *BHLHB3* contient deux E-box de classe B, une en position distale et une en position proximale. Seule cette dernière est impliquée dans la répression. Ce motif montre une grande affinité pour BHLHB2 et sa mutation réduit fortement la réponse de *BHLHB3* à BHLHB2. BHLHB2 réprime donc l'expression de *BHLHB3* en se fixant sur son promoteur au niveau d'un motif E-Box.

L'expression de BHLHB2 et BHLHB3 dans le carcinome du côlon représente un exemple physiopathologique d'exclusion mutuelle de ces deux protéines. Ainsi, BHLHB2 est fortement exprimé dans les tissus tumoraux mais absent des tissus périphériques. A l'inverse, l'expression de BHLHB3 est très faible au sein du carcinome mais fortement induite dans les tissus adjacents. Au sein du carcinome, la forte expression de BHLHB2, induite par l'hypoxie liée au développement tumoral, inhibe l'expression de BHLHB3 et inversement dans les tissus adjacents au carcinome (Ivanova *et al.* 2001; Li *et al.* 2003).

## **2.2. Implications physiologiques de BHLHB2 et BHLHB3**

Les répresseurs BHLHB2 et BHLHB3 semblent pouvoir interagir avec un très vaste panel de facteurs de transcription, et notamment les facteurs de la famille bHLH. BHLHB2 et BHLHB3 sont donc impliqués dans la plupart des processus biologiques mettant en jeu les facteurs bHLH. L'éventail d'action de ces facteurs étant très large, incluant tout mécanisme impactant l'homéostasie cellulaire, les facteurs BHLHB2 et BHLHB3 jouent un rôle dans de nombreux processus physiologiques, dont le développement embryonnaire la croissance, la différenciation et la mort cellulaire, l'oncogenèse, l'activation du système immunitaire, la réponse à l'hypoxie, l'homéostasie métabolique (Table 2) (Yamada and Miyamoto 2005). En outre, BHLHB2 et BHLHB3 sont des acteurs essentiels de l'horloge moléculaire régulant le cycle circadien, aussi bien au niveau du système nerveux central que des organes périphériques. Nous ne développerons ici que leur implication dans la régulation de la croissance et de la différenciation cellulaire, fonction dont l'étude a conduit à leur clonage.



Fonction biologique	Acteur	Effet	Cellules ou Tissu	Références
<b>Différenciation Cellulaire</b>				
Différenciation des trophoblastes	BHLHB2	↗	Cellules souches trophoblastiques, cytotrophoblastes Embryogénèse	Janatpour, 1999; Hughes, 2004; El-Hashash, 2005
Différenciation neuronale	BHLHB2	↗	Cellules P19, PC12, Embryogénèse, Cellules souches mésenchymateuses	Boudjelal, 1997; Rossner, 1997
Différenciation des chondrocytes	BHLHB2	↗	Chondrocytes embryonnaire humains, cellules ATDC5, Embryogénèse, Cellules souches mésenchymateuses	Shen, 1997; Shen, 2002; MacLean, 2004
Différenciation adipocytaire	BHLHB2	↘	Cellules 3T3-L1, Cellules souches mésenchymateuses	Kim, 2005; Iwata, 2006; Gulbacci, 2009
Différenciation de la glande mammaire	BHLHB2 BHLHB3	↗ ↘	Epithélium mammaire	St Pierre, 2004
Différenciation des lymphocytes B	BHLHB2	↗	Cellules B spléniques non stimulées, souris <i>stra13</i> -/-	Seimiya, 2002; Seimiya, 2004
<b>Croissance Cellulaire et Oncogénèse</b>				
Cancer, Développement tumoral	BHLHB2 BHLHB3	↗ ↘	Cancer du côlon, du pancréas, du poumon, du sein. Tumeurs hypoxiques	Yon, 2001; Turley, 2004; Li, 2002; Chakrabarti, 2004; Falvella 2008
<b>Arrêt de la croissance cellulaire</b>	BHLHB2	↗	Cellules P19, NIH 3T3, HaCaT, ATDC5	Boudjelal, 1997; Sun, 2000; Zawal, 2002; Shen, 2002
<b>Autres Fonctions</b>				
Hypoxia	BHLHB2 BHLHB3	↗	Adipocytes, Cellules ATDC5, HEK 293T, cellules tumorales pancréatiques, chondrocytes	Choi, 2008; Chen 2006; Kim, 2005; Chakrabarti, 2004
Cycle Circadien	BHLHB2 BHLHB3	↗	Système nerveux central, Tissus périphériques	Honma, 2002; Butler, 2004; Rossner, 2008; Nakashima, 2008; Hamaguchi, 2004; Kawamoto, 2004
Réponse Immunitaire	BHLHB2	↗ ↘	Cellules T, B et NK (Natural Killer)	Seimiya, 2002; Seimiya, 2004; Sun 2001; Ivanova, 2004; Nakayama, 2000

**Table 2 : Implications de BHLHB2 et BHLHB3 dans diverses fonctions physiologiques**

d'après Yamada et Miyamoto, 2005

### **2.2.1. Expression de BHLHB2 et BHLHB3 au cours du développement**

Au cours de l'embryogenèse, BHLHB2 est exprimé dans le neuro-ectoderme, mais aussi dans certains tissus dérivés du mésoderme et de l'endoderme (Boudjelal *et al.* 1997). L'expression de BHLHB2 est également observée lors de la différenciation des trophoblastes au sein du placenta (Janatpour *et al.* 1999). L'expression de BHLHB2 est ensuite induite chez le fœtus au cours de l'ossification endochondrale (MacLean and Kronenberg 2004).

BHLHB3, quant à lui, est exprimé aux stades embryonnaires précoces dans des régions dorsales spécifiques du développement cérébral, dans le cœur, le système olfactif et les bourgeons des membres. Aux stades plus tardifs, il s'exprime dans le foie, les glandes thyroïde et surrénales (Azmi and Taneja 2002).

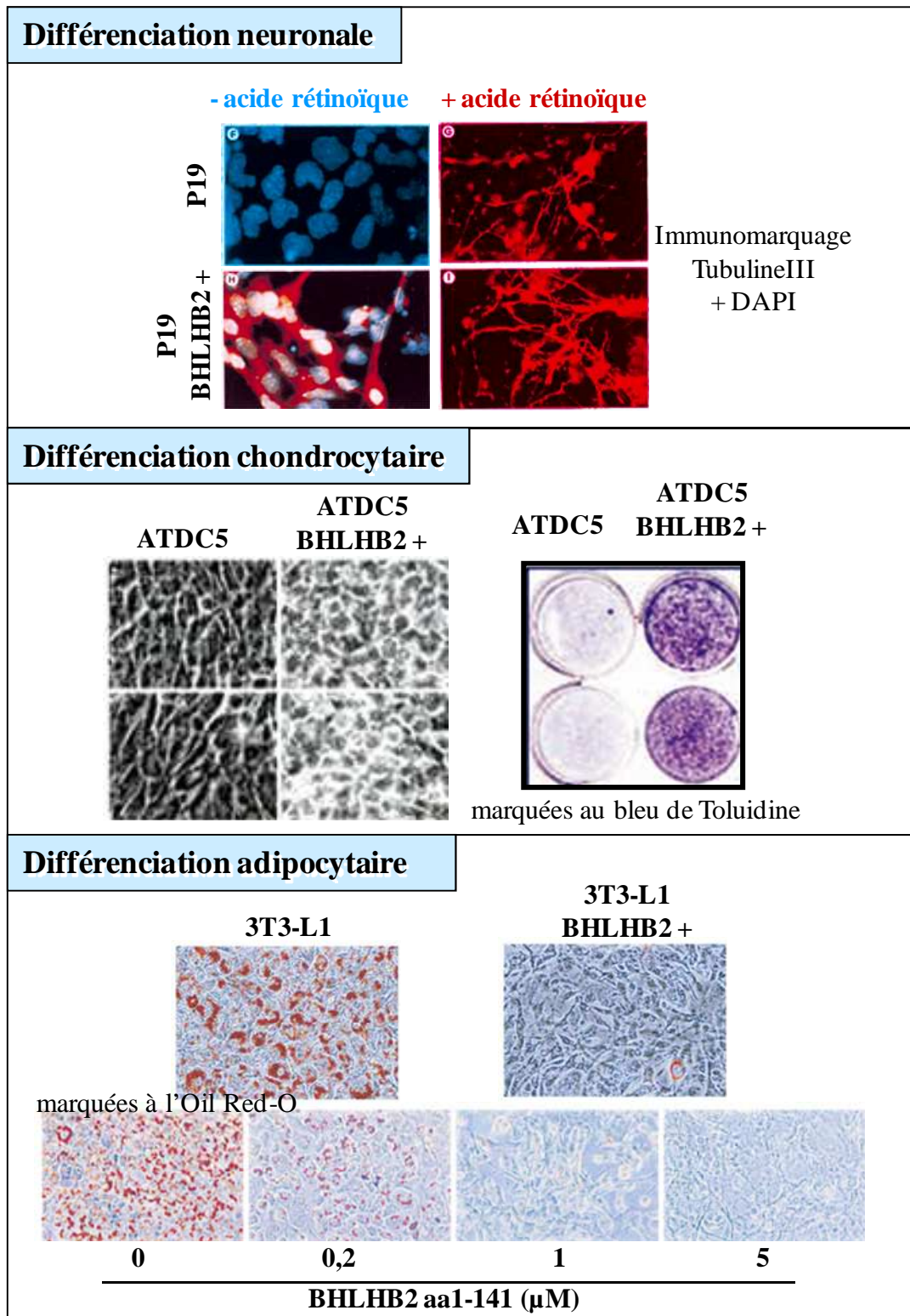
Si le niveau d'expression de BHLHB2 et BHLHB3 est faible dans le système nerveux central aux stades embryonnaires, il s'élève rapidement au cours du développement post-natal (Rossner *et al.* 1997).

BHLHB2 et BHLHB3 sont donc largement exprimés au cours du développement embryonnaire, et leur expression finement régulée, ce qui reflète leur implication dans de nombreux processus de différenciation cellulaire.

### **2.2.2. Régulateurs de la croissance et de la différenciation cellulaire**

BHLHB2 et BHLHB3 sont étroitement associés à la régulation de la croissance cellulaire. De nombreux signaux provoquant l'arrêt de la croissance cellulaire, comme l'acide rétinolique, le TGF $\beta$ , la TSA ou encore la déplétion en sérum du milieu de culture cellulaire, induisent l'expression de BHLHB2 (Yamada and Miyamoto 2005). D'une façon générale, l'expression de BHLHB2 est faible dans les cellules en prolifération et augmente à l'arrêt du cycle cellulaire. Ainsi, BHLHB2 est exprimé dans les lymphocytes B non stimulés et décroît rapidement lors de l'activation de ces cellules (Seimiya *et al.* 2002). La surexpression de BHLHB2 retarde la progression du cycle cellulaire en phase S. Dans les cellules 3T3, l'arrêt de la croissance cellulaire par la TSA s'accompagne d'une induction de l'expression de BHLHB2 qui inhibe *C-MYC*, gène associé à la prolifération cellulaire (Sun and Taneja 2000). Cependant, l'effet biologique de BHLHB2 semble dépendre du type cellulaire. Ainsi,

l'activation de BHLHB2 par le TGF $\beta$  favorise la survie de cellules tumorales issues de cancer du sein (Ehata *et al.* 2007). Ainsi, la surexpression de BHLHB2 ou BHLHB3 induit ou inhibe la différenciation cellulaire de façon tissu-spécifique.



**Figure 31** :Effet de BHLHB2 sur la différenciation cellulaire d'après Boudjelal *et al.* 1997 ; Shen *et al.* 2002 ; Yun *et al.* 2002

### a) Différenciation neuronale

En fonction des conditions de culture et de la concentration en acide rétinoïque, les cellules P19 peuvent se différencier en 3 lignages embryonnaires différents: endodermique, mésodermique ou ectodermique. Cultivée en monocouche, elles se différencient sous l'action de l'acide rétinoïque en mésoderme et endoderme. Lorsqu'elles sont sous forme d'agrégats cellulaires, l'acide rétinoïque induit leur différenciation en cellules neuronales, ressemblant aux neurones embryonnaires.

L'identification des gènes impliqués dans la différenciation des cellules P19 sous l'action de l'acide rétinoïque a conduit au clonage du gène *Stra13* ou *BHLHB2*. La surexpression de *BHLHB2* dans des cellules P19 cultivée en monocouche induit leur différenciation neuronale, en inhibant leur détermination en lignage endodermique ou mésodermique (Figure 31) (Boudjelal *et al.* 1997).

De fait, *BHLHB2*, ainsi que *BHLHB3*, sont fortement exprimés dans le système nerveux central, au sein des neurones matures. Par conséquent, ces deux facteurs apparaissent impliqués dans la différenciation neuronale terminale ainsi que dans les processus d'adaptation cérébrale chez l'adulte. En effet, leur expression est stimulée par le facteur de croissance neuronale *NGF in vitro*, ainsi que par l'activité neuronale induite par l'acide kaïnique *in vivo*. Ce couplage de l'expression de *BHLHB2-B3* à la stimulation neuronale suggère leur implication dans les processus d'adaptation neuronale se produisant au cours du développement tardif du système nerveux central et dans le cerveau adulte (Rossner *et al.* 1997).

### b) Chondrogenèse et Ostéogenèse

L'expression de *BHLHB2* est stimulée au cours de la différenciation *in vitro* de chondrocytes en réponse à l'AMP cyclique (Shen *et al.* 1997). De plus les facteurs favorisant la chondrogenèse,  $TGF\beta$ , *BMP-2* et insuline, activent tous l'expression de *BHLHB2*. *BHLHB2* induit en effet la différenciation chondrogénique de plusieurs modèles cellulaires lorsqu'il est surexprimé (Figure 31) (Shen *et al.* 2002).

*BHLHB2* est exprimé par de très nombreux tissus mais l'hybridation *in situ* sur des embryons de souris montre que les ARNm de *BHLHB2* sont plus abondant dans le cartilage que dans les tissus environnants (MacLean and Kronenberg 2004).

*In vivo*, la chondrogenèse se déroule en conditions hypoxiques, or l'expression de *BHLHB2* est induite par HIF-1, facteur de transcription activé par l'hypoxie. Ainsi, l'hypoxie est suffisante pour induire la différenciation chondrogénique des cellules ATC5, via l'activation par HIF de l'expression de *BHLHB2* (Chen *et al.* 2006). *BHLHB2* induit ainsi la chondrogenèse *in vitro* comme *in vivo*.

L'expression de *BHLHB2* s'élève également après l'induction ostéogénique de cellules souches mésenchymateuses. La surexpression de *BHLHB2* dans ces cellules induit l'expression de plusieurs marqueurs ostéogéniques, et accélère leur différenciation ostéogénique et leur calcification, lorsqu'elles sont placées dans un milieu de différenciation favorisant l'ostéogenèse (Iwata *et al.* 2006).

### c) Adipogenèse

La différenciation adipogénique est finement contrôlée par deux familles de protéines : les facteurs de transcription CCAAT/enhancer binding protein, C/EBP et les récepteurs nucléaires peroxysomes proliferator-activated receptors PPAR. Lorsque la différenciation des préadipocytes est induite, C/EBP $\beta$  et C/EBP $\delta$  sont rapidement induit et activent l'expression de C/EBP $\alpha$  et PPAR $\gamma$  qui, en retour, régulent l'expression de nombreux gènes impliqués dans la différenciation terminale des adipocytes (Brun *et al.* 1996).

Parmi ces facteurs, PPAR $\gamma$  joue un rôle essentiel, son expression suffisant à induire la différenciation adipogénique de fibroblastes (Spiegelman *et al.* 1997).

L'hypoxie bloque l'adipogenèse en inhibant l'expression de PPAR $\gamma$ 2. Cette inhibition est due à l'activation par l'hypoxie de *BHLHB2* (Yun *et al.* 2002). En effet, la surexpression de *BHLHB2* bloque la différenciation adipogénique des cellules 3T3-L1 en inhibant l'expression de PPAR $\gamma$ 2 et de C/EBP $\alpha$  (Figure 31). Les marqueurs tardifs de différenciation adipocytaire AP2, GLUT4 et SREBP-1c, cibles de PPAR $\gamma$  et C/EBP $\alpha$ , ne s'expriment pas non plus. Pourtant, l'expression de C/EBP $\beta$  n'est pas altérée dans ces cellules et C/EBP $\beta$  se lie correctement au niveau de motifs CAAT sur le promoteur de PPAR  $\gamma$ 2 (Kim *et al.* 2005).

Une étude récente montre que *BHLHB2* inhibe l'activité transcriptionnelle de C/EBP $\beta$  et C/EBP $\alpha$  par interaction directe (Gulbagci *et al.* 2009). Cette interaction protéique n'empêche pas la liaison de C/EBP $\beta$  à l'ADN mais favorise le recrutement de HDAC1. Le

promoteur de PPAR $\gamma$ 2 présente effectivement une diminution de l'acétylation des histones 3 et 4, cibles de l'activité de HDAC1. BHLHB2 réprime donc l'activité de C/EBP $\beta$  en stabilisant son interaction avec les co-répresseurs, empêchant la transcription des gènes adipogéniques.

Etant donné son effet sur l'adipogénèse, une expression aberrante de BHLHB2 pourrait être associée au développement de l'obésité.

Par ailleurs, BHLHB2 inhibe la différenciation adipogénique des cellules souches mésenchymateuses (Iwata *et al.* 2006). Nous avons présenté ci-dessus son rôle activateur dans la différenciation chondrogénique et ostéogénique de ces mêmes cellules, en fonction du milieu de différenciation dans lequel elles sont cultivées. BHLHB2, induisant à la fois la chondrogenèse et l'ostéogenèse, n'apparaît pas être impliqué dans la détermination cellulaire, mais semble pouvoir favoriser ou freiner l'un ou l'autre processus de différenciation en fonction de l'environnement cellulaire.

BHLHB2 et BHLHB3 semblent donc agir sur la différenciation cellulaire en coopération avec les autres facteurs de transcription exprimés par la cellule. Leur rôle dans la différenciation dépend donc du type cellulaire et des signaux extracellulaires auxquels leur expression et celle de leurs partenaires sont soumises.

### **2.2.3. BHLHB2 et BHLHB3 dans le muscle squelettique**

#### **a) Expression musculaire *in vitro* et *in vivo***

BHLHB2 est exprimé tardivement dans le muscle en développement, à 17,5 jours post-coïtum chez la souris. Son expression se superpose à celle de HES1, suggérant une possible redondance fonctionnelle entre ces deux facteurs de la même famille (Boudjelal *et al.* 1997). BHLHB2 n'apparaît pas indispensable au cours de la myogenèse embryonnaire, les souris KO *BHLHB2* ne présentant aucune altération de leur musculature.

Absente du myotome somitique, l'expression de BHLHB3 apparaît dans le myotome et dans les bourgeons des membres lorsque débute la myogenèse primaire. D'abord exprimé au centre des bourgeons des membres, où il favorise la différenciation chondrogénique, son

expression se déplace latéralement pour marquer les muscles en développement (Azmi and Taneja 2002).

L'expression de BHLHB2 et BHLHB3 persiste dans le muscle adulte.

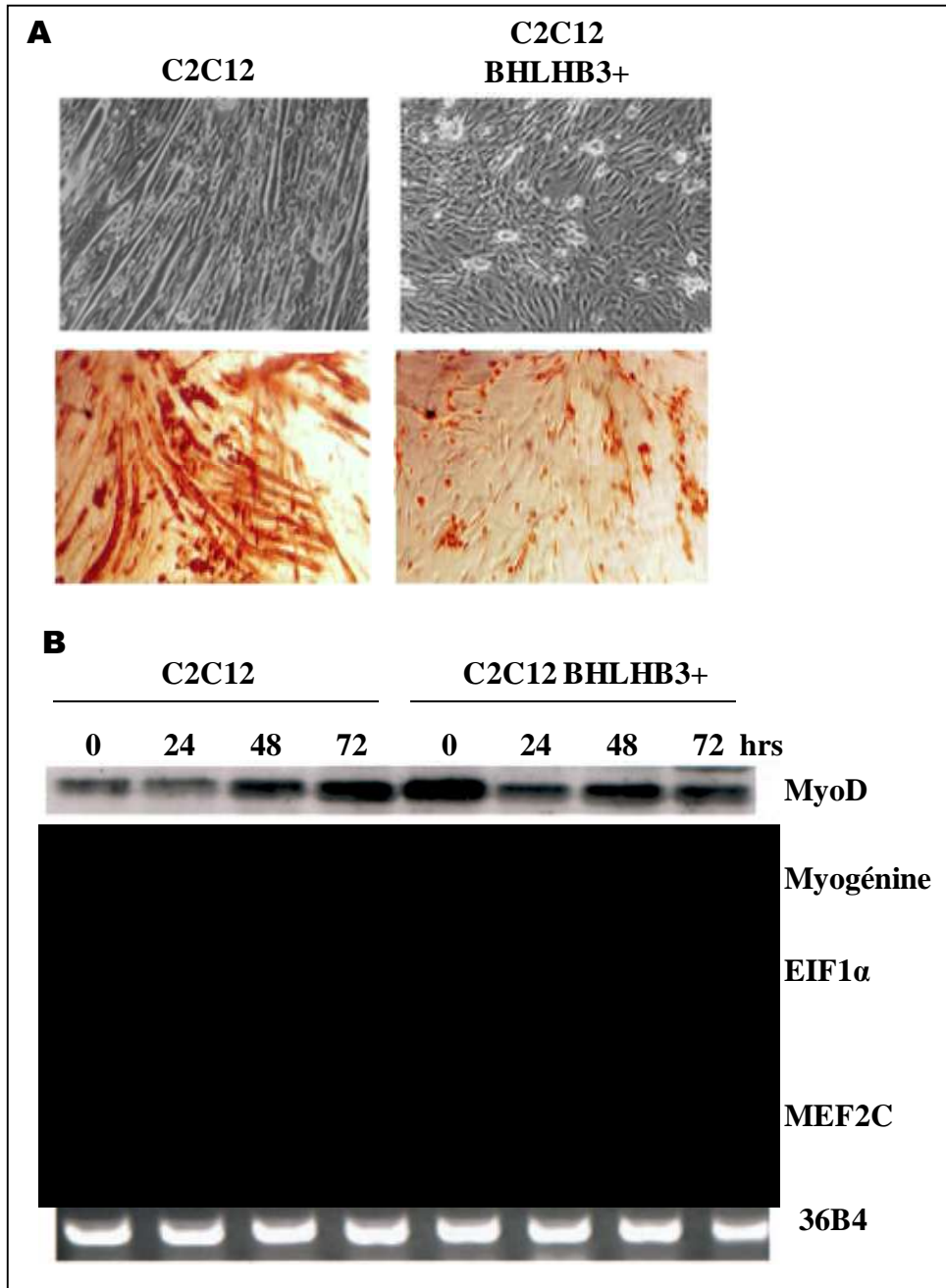
*In vitro*, BHLHB2 est exprimé à faible niveau au cours de la prolifération de myoblastes de souris en culture primaire. Son expression augmente transitoirement lorsque la différenciation cellulaire est induite. Au contraire, BHLHB3 est fortement exprimé dans les myoblastes C2C12 en prolifération, puis son expression chute graduellement au cours de la différenciation (Azmi *et al.* 2004; Sun *et al.* 2007a).

Cette régulation précise de BHLHB2 et BHLHB3 au cours du développement et de la différenciation myogénique *in vitro*, suggère qu'ils peuvent jouer un rôle dans la myogenèse. Cependant, ils présentent des profils d'expression radicalement opposés au cours de la différenciation *in vitro* de myoblastes en myotubes.

## **b) Implication dans la myogenèse**

### **➤ Inhibition de la différenciation myogénique**

BHLHB3 est exprimé dans les myoblastes en prolifération de la lignée musculaire murine C2C12. Lorsque la différenciation myogénique de ces cellules est induite, l'expression de BHLHB3 chute progressivement après 48 et 72h. Cette inhibition de l'expression de BHLHB3 au cours de la différenciation suggère que BHLHB3 joue un rôle négatif sur la myogenèse. En effet, une surexpression modérée de BHLHB3 dans des C2C12, à un niveau seulement 4 fois supérieur à l'endogène, bloque complètement la formation de myotubes (Figure 32). Dans les cellules surexprimant BHLHB3, l'expression de la myosine, marqueur de différenciation myogénique terminal, est très faible. L'expression de la myogénine et de MEF2C est également altérée dans ces cellules. Par contre, MyoD est correctement exprimé (Figure 32) (Azmi *et al.* 2004).



**Figure 32: Inhibition de la différenciation myogénique par BHLHB3**

d'après Azmi *et al.* 2004

L'incapacité des cellules surexprimant BHLHB3 à se différencier n'est pas due à un défaut de progression du cycle. Au contraire, comme le montre la diminution précoce de l'expression de la cycline D1, BHLHB3 favorise l'arrêt de la croissance cellulaire nécessaire à la différenciation (Azmi *et al.* 2004). Ainsi, comme BHLHB2, dont la surexpression induit l'arrêt de la croissance cellulaire dans de nombreux modèles, BHLHB3 est également un inhibiteur de la croissance cellulaire. Afin de permettre la différenciation des myoblastes en

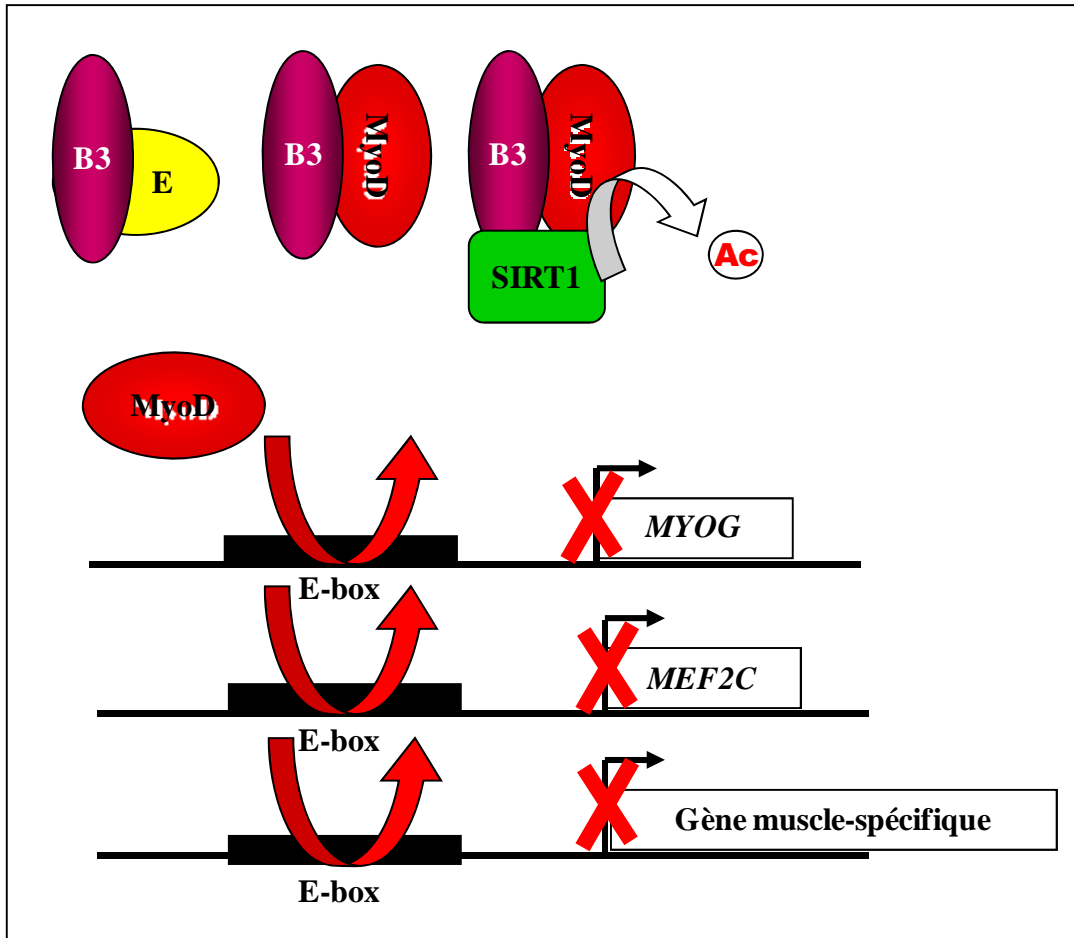


myotubes, MyoD également induit l'arrêt de la croissance cellulaire en activant l'expression de l'inhibiteur des cyclines kinases-dépendantes, p21Cip1. Cependant, malgré un arrêt rapide de la croissance cellulaire, l'expression de p21 n'augmente pas les C2C12 surexprimant BHLHB3. L'activité transcriptionnelle de MyoD apparaît donc réduite dans ces cellules.

MyoD seul suffit à induire la différenciation de cellules fibroblastiques 10T1/2 en myotubes. La co-transfection de BHLHB3 inhibe la différenciation myogénique des 10T1/2 induite par MyoD. BHLHB3 supprime donc l'activité myogénique de MyoD (Azmi *et al.* 2003).

En effet, BHLHB3 bloque l'activité transcriptionnelle de MyoD. MyoD active l'expression de la Créatine Kinase musculaire, MCK, en se liant au promoteur de *MCK* au niveau de trois motifs E-Box. La surexpression de BHLHB3 inhibe l'expression de la MCK dans les C2C12 et bloque l'activation transcriptionnelle de son promoteur par MyoD, sous forme de dimère avec les protéines E-12 ou E-47. BHLHB3 pourrait réprimer l'expression de *MCK* par compétition avec MyoD pour la liaison à l'ADN au niveau des motifs E-Box. Mais BHLHB3 ne se fixe pas sur les motifs E-Box du promoteur de *MCK*. En revanche, BHLHB3 peut interagir directement avec MyoD, et les protéines E-12 et E-47. L'interaction entre MyoD et BHLHB3 implique à la fois leur HLH et leur domaine basique de liaison à l'ADN. L'hétérodimère MyoD-BHLHB3 est donc incapable de se lier à l'ADN. Ainsi, BHLHB3 inhibe l'activité transcriptionnelle de MyoD, d'une part en séquestrant les protéines E, partenaires indispensables à l'activité transcriptionnelle de MyoD, et d'autre part en se liant directement à MyoD et empêchant sa liaison à l'ADN ( Figure 33) (Azmi *et al.* 2003; Azmi *et al.* 2004; Fujimoto *et al.* 2007).

Enfin, il a récemment été montré que BHLHB3 pouvait interagir avec la déacétylase SIRT1. Par ailleurs, SIRT1 est décrite pour réprimer l'activité de MyoD par déacétylation, inhiber ainsi l'expression des gènes muscle-spécifiques et empêcher la différenciation myogénique (Fulco *et al.* 2003). SIRT1 pourrait donc participer à la répression de l'activité transcriptionnelle de MyoD par BHLHB3 (Figure 33).



**Figure 33** : Répression de l'activité transcriptionnelle de MyoD par BHLHB3

d'après Azmi *et al.* 2002 ; Fujimoto *et al.* 2007

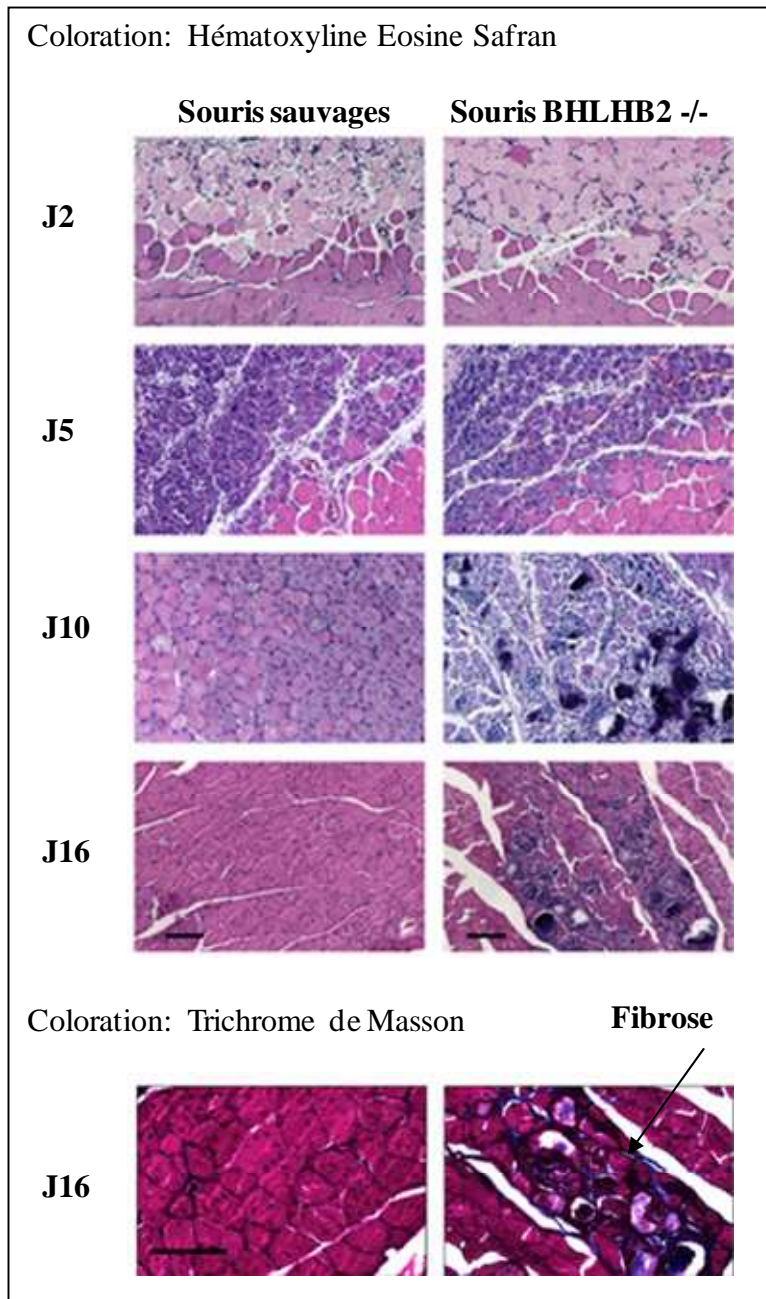
Comme BHLHB3, BHLHB2 possède également la capacité de se lier à MyoD. La surexpression de BHLHB2 inhibe également l'activation transcriptionnelle de la CKM par MyoD et même potentialise l'effet répresseur de BHLHB3 (Fujimoto *et al.* 2007). Cependant, le rôle de BHLHB2 au cours de la différenciation de cellules myogéniques apparaît, au travers d'une étude récente menée chez les souris KO *BHLHB2*, radicalement différent. En effet, les myoblastes isolés à partir des souris *BHLHB2*<sup>-/-</sup> présentent une capacité à se différencier plus faible que les myoblastes issus de souris sauvages. Le rétablissement de l'expression de BHLHB2 dans ces myoblastes restaure leur capacité de différenciation (Sun *et al.* 2007a). Dans ce cas, BHLHB2 paraît donc favoriser la différenciation myogénique.

### ➤ **Activation des cellules satellites**

Si BHLHB2 est impliqué dans la différenciation myogénique *in vitro*, son expression, *in vivo*, n'est pas nécessaire à la myogenèse embryonnaire, le Knock Out de *BHLHB2* n'altérant ni la morphologie, ni la taille des fibres musculaires, ni le nombre de cellules satellites au sein des muscles squelettiques des souris transgéniques (Sun *et al.* 2001 ; Fujimoto *et al.* 2007).

Par contre, les souris *BHLHB2*<sup>-/-</sup> présentent un défaut de régénération musculaire suite à une lésion, se caractérisant par la présence de myotubes dégénérés, la persistance de cellules mononuclées et le développement d'une fibrose (Figure 34) (Sun *et al.* 2007a).

La régénération musculaire s'effectue en deux étapes : tout d'abord, les cellules satellites, activée par divers signaux émis lors de la survenue d'une lésion musculaire, sortent de leur état de quiescence et prolifèrent pour générer des myoblastes exprimant MyoD. Puis, la croissance cellulaire des myoblastes s'arrête pour permettre leur différenciation en myotubes. L'expression de MyoD diminue alors (Buckingham 2007). Au cours des cinq premiers jours de la régénération musculaire, l'expression de MyoD, dans le muscle lésé des souris transgéniques *BHLHB2*<sup>-/-</sup> comme dans celui des souris sauvages, augmente suivant l'expansion clonale des myoblastes, cependant l'expression de MyoD apparaît plus forte chez les souris *BHLHB2*<sup>-/-</sup>, reflétant une activation accrue des cellules satellites. Dix jours après la lésion, l'expression de MyoD diminue dans le muscle des souris sauvages. Au contraire, dans le muscle des souris *BHLHB2*<sup>-/-</sup>, un grand nombre de cellules continue d'exprimer MyoD et de proliférer. Les souris *BHLHB2*<sup>-/-</sup> montrent donc une activation soutenue des cellules satellites après une lésion musculaire. L'arrêt de la croissance cellulaire des myoblastes étant indispensable à la différenciation musculaire, les myoblastes des souris *BHLHB2*<sup>-/-</sup> échouent à former de nouveaux myotubes et ainsi à régénérer efficacement le muscle lésé. En effet, cultivés *in vitro*, ces myoblastes présentent une incapacité à fusionner et à se différencier en myotubes (Sun *et al.* 2007a).



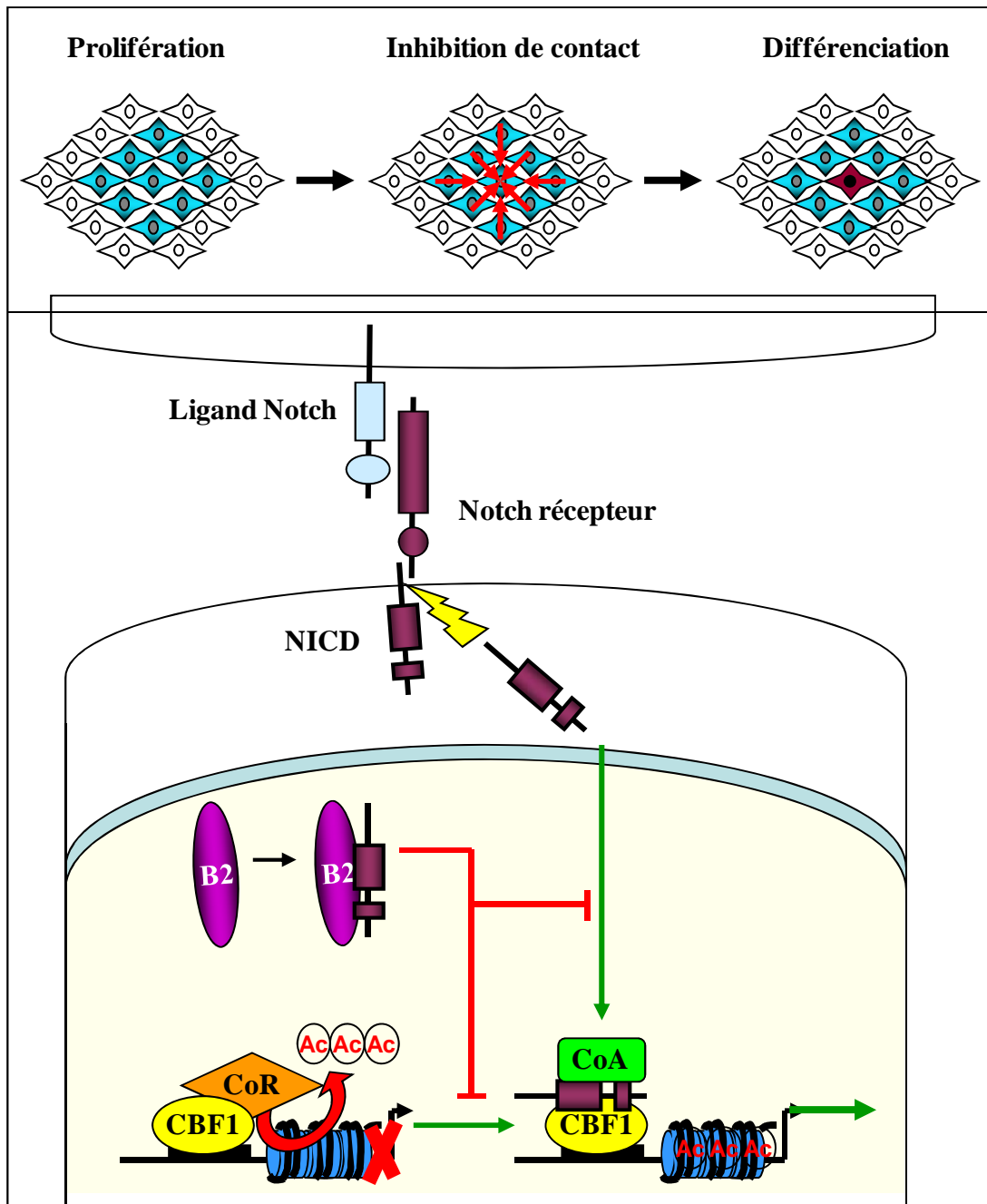
**Figure 34** : Régénération musculaire après lésion chez les souris déficientes en BHLHB2

d'après Sun *et al.* 2007

Les myoblastes des souris *BHLHB2*<sup>-/-</sup> présentent un phénotype similaire aux myoblastes exprimant une forme constitutivement active de Notch (Conboy and Rando 2002). L'activation de la voie Notch est indispensable à l'activation des cellules satellites et à l'expansion clonale des myoblastes, mais elle inhibe la différenciation myogénique. La voie Notch est activée par la liaison de Notch, récepteur intramembranaire, à un de ses ligands. Cette interaction provoque le clivage protéolytique de Notch, la libération et le transport dans le noyau du domaine intracellulaire de Notch, NICD. Au sein du noyau, NICD interagit avec le facteur de transcription lié à l'ADN, CBF-1/RBPJκ. Cette association déplace les co-répresseurs transcriptionnels lié à CBF-1, permet le recrutement de co-activateurs et la transcription des gènes cibles de la voie Notch, entre autres, les facteurs de transcription de la famille bHLH-O, HES 1, 5, Hey 1, 2 et L (Luo *et al.* 2005; Vasyutina *et al.* 2007).

Les myoblastes des souris *BHLHB2*<sup>-/-</sup> montrent une élévation de l'activité transcriptionnelle de NICD/CBF-1. De plus, l'expression de Hey1, cible de NICD/CBF-1 est également plus élevée dans les myoblastes *BHLHB2*<sup>-/-</sup> en prolifération. L'expression de Hey1 est maintenue après l'induction de la différenciation, alors qu'elle diminue dans les myoblastes sauvages. NICD est donc plus activé dans les myoblastes *BHLHB2*<sup>-/-</sup>. *In vivo*, la voie Notch est également plus active dans le muscle en régénération des souris *BHLHB2*<sup>-/-</sup>. La diminution du taux de prolifération des myoblastes et la restauration d'une régénération efficace, par l'administration d'un ligand soluble inhibant Notch, prouve que l'activation constitutive de la voie Notch est à l'origine du défaut de régénération musculaire des souris *BHLHB2*<sup>-/-</sup> (Sun *et al.* 2007a).

L'activation de NICD est maintenue au cours de la différenciation et de la régénération en l'absence de BHLHB2, suggérant que BHLHB2 est un inhibiteur de la voie Notch (Figure 35). En effet, la surexpression de BHLHB2 inhibe l'activation transcriptionnelle de Hey 1 par NICD. Le mécanisme par lequel BHLHB2 réprime NICD passe par une interaction protéique directe. BHLHB2 se lie à NICD, bloquant ainsi son association avec CBF-1 et inhibant l'expression des gènes cibles de la voie Notch (Sun *et al.* 2007a).



**Figure 35 : Inhibition de la voie Notch par BHLHB2**

d'après Sun *et al.* 2007

Ainsi, BHLHB2 joue un rôle essentiel dans la régénération musculaire : en contribuant à l'arrêt de la croissance cellulaire des myoblastes par l'inhibition de la voie Notch, il favorise la différenciation myogénique, aboutissant à la régénération des fibres musculaires lésées.

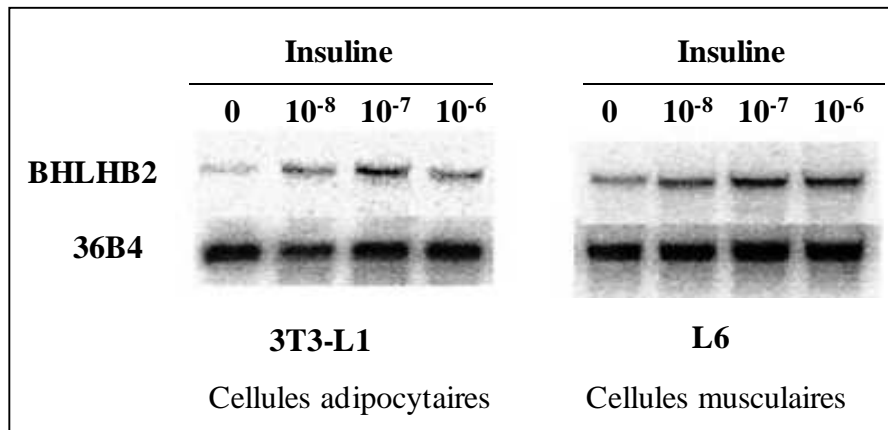
### c) Régulations métaboliques

Les répresseurs transcriptionnels BHLHB2 et BHLHB3 semblent donc jouer un rôle important, bien qu'apparemment opposé, dans la différenciation myogénique, et apparaissent ainsi fondamentalement impliqués dans la fonction musculaire. Le maintien de la fonction et du phénotype musculaire est soumis aux variations du métabolisme musculaire, lui-même régulé par de nombreux signaux intra- et extracellulaire. Parmi ces signaux, l'insuline, via les voies PI3Kinase et MAPKinases, et l'activation de la voie AMPKinase sont des régulateurs majeurs de l'homéostasie énergétique musculaire. Plusieurs études montrent que l'expression de BHLHB2 et BHLHB3 répond à ces signaux métaboliques.

#### ➤ Régulation par l'insuline

Le muscle squelettique est le principal site d'utilisation du glucose sanguin en réponse à l'insuline. L'insuline stimule l'utilisation du glucose par le muscle squelettique en augmentant ses capacités de transport de glucose, en activant l'oxydation et le stockage du glucose, sous forme de glycogène et d'acides gras, en stimulant la lipogenèse. L'insuline a également une fonction anabolique sur le muscle squelettique en stimulant la synthèse de protéines. En outre, elle module le phénotype des fibres musculaires, favorisant le maintien des fibres lentes à fortes capacités oxydatives. Ainsi, les patients diabétiques de type 2 souffrant d'une insulino-résistance musculaire présentent une diminution du nombre de fibres lentes oxydatives au profit des fibres rapides glycolytiques (Oberbach *et al.* 2006).

Plusieurs études montrent que l'expression de BHLHB2 est activée par l'insuline dans le muscle squelettique, *in vitro* comme *in vivo* (Figure 36). Ainsi, Kawata *et al.* (2004), montrent que le traitement des myotubes obtenus à partir de la lignée cellulaire musculaire de rat L6, par des doses croissantes d'insuline, stimule l'expression de BHLHB2, au niveau ARNm et protéine, de façon dose-dépendante. L'effet de l'insuline sur BHLHB2 dans ces cellules passe par l'activation de la voie des MAPKinases et non par la voie PI3Kinase (Kawata *et al.* 2004). L'activation de l'expression de BHLHB2 par l'insuline est confirmée dans des myotubes humains en culture (Hansen *et al.* 2004).



**Figure 36** : Activation de l'expression de BHLHB2 par l'insuline  
d'après Yamada *et al.* 2003

L'étude transcriptomique d'échantillons musculaires prélevés sur des sujets sains après un clamp hyperinsulinique-euglycémique ou une exposition à une hyperinsulinémie physiologique, révèle, qu'*in vivo* également, BHLHB2 est exprimé en réponse à l'insuline dans le muscle squelettique humain (Rome *et al.* 2003; Parikh *et al.* 2007; Coletta *et al.* 2008).

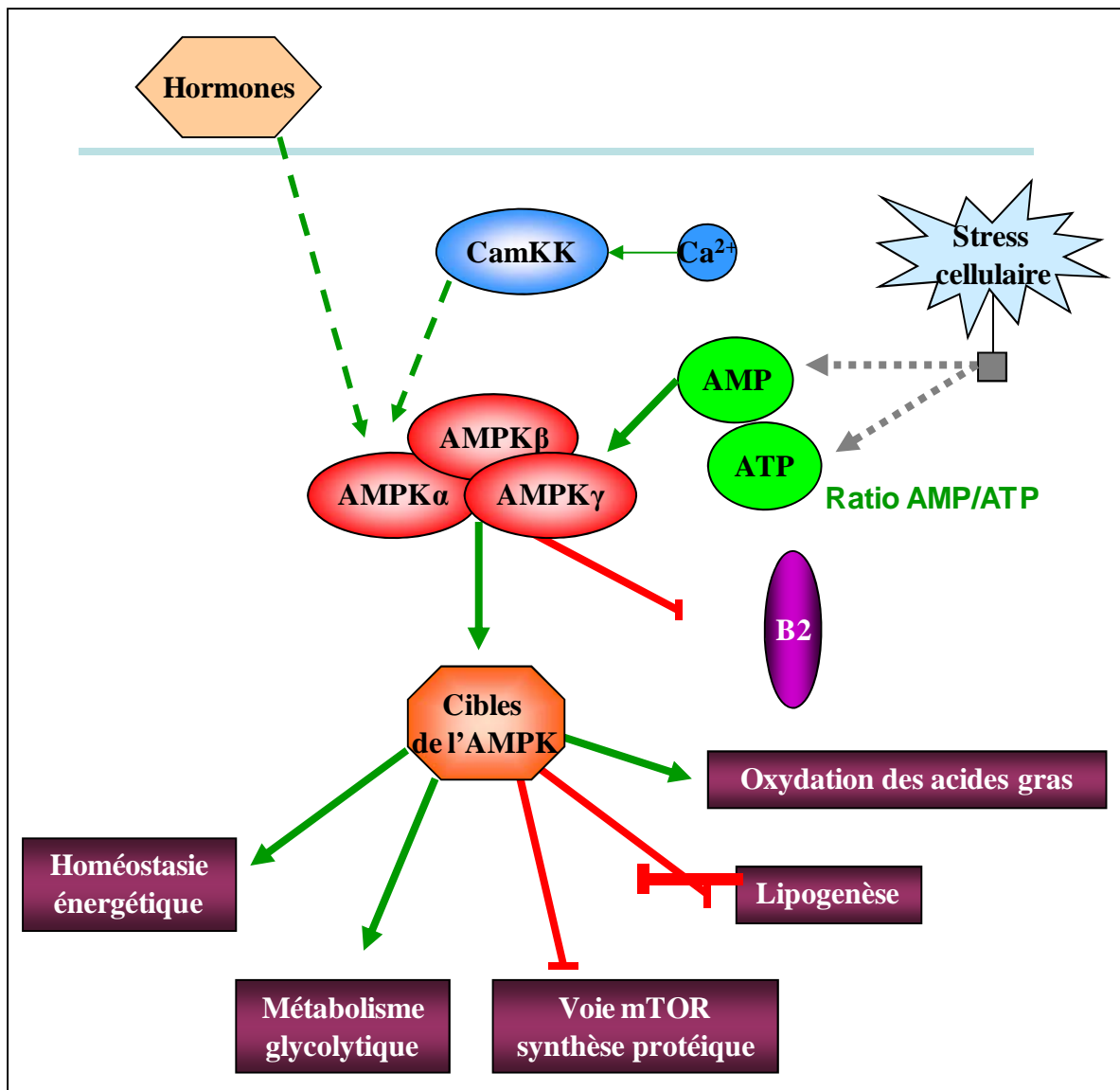
### ➤ Régulation par l'AMPKinase

L'AMPKinase, ou 5'adenosine monophosphate-activated protein kinase, joue un rôle clé dans la régulation du métabolisme énergétique en tant que détecteur de l'état énergétique de la cellule. L'AMPK est activée en cas d'élévation du rapport intracellulaire AMP/ATP au cours de l'exercice physique ou de l'hypoxie. Une fois activée, l'AMPK favorise les réactions métaboliques génératrices d'ATP, telles que l'oxydation des acides gras et la glycolyse, et réduit les réactions biochimiques consommatrices d'ATP, comme la lipogenèse. Dans le muscle squelettique, elle stimule le transport de glucose et l'oxydation des acides gras au cours de l'exercice. A plus long terme, elle augmente la biogenèse et les capacités d'oxydation mitochondriales, ainsi que le stockage de glycogène musculaire (Figure 37) (Trebbak and Wojtaszewski 2008).

L'AICAR, AMPK activator 5-amino-4-imidazole-carboxamide riboside, active l'AMPK *in vitro* et *in vivo*. L'expression de plusieurs gènes de l'horloge moléculaire régulant le rythme circadien est altérée dans le muscle squelettique de souris suite à une injection d'AICAR. Parmi ces gènes, BHLHB2 voit son expression réprimée par l'activation de



l'AMPKinase. L'expression de *BHLHB3* ne varie pas. L'injection d'AICAR stimule en parallèle l'expression du gène *cry2*. L'effet de l'AICAR sur l'expression de *BHLHB2* et *cry2* est aboli dans le muscle des souris dont le gène codant pour la sous unité AMPK $\gamma$ 3 à été invalidé. L'activation de l'AMPKinase inhibe donc l'expression de BHLHB2, via la sous-unité AMPK $\gamma$ 3 (Figure 37) (Vieira *et al.* 2008).



**Figure 37:** Voie de signalisation de l'AMPKinase

d'après Vieira *et al.* 2008

L'homéostasie énergétique, incluant la glycolyse, la phosphorylation oxydative et le métabolisme lipidique, est soumise à la régulation circadienne afin de synchroniser la dépense énergétique de l'organisme au rythme biologique de l'individu. En retour, l'état métabolique influe sur la régulation des rythmes circadiens périphériques. BHLHB2, intégrant les signaux métaboliques transmis par l'AMPKinase et l'insuline, fait le lien entre le métabolisme énergétique et la synchronisation du rythme circadien.

Aucune étude ne fait part de l'influence de la régulation métabolique sur l'expression de BHLHB3. Etant donné sa grande homologie structurale et fonctionnelle avec BHLHB2 et son expression dans le muscle squelettique, BHLHB3 pourrait, de la même façon, être régulé en réponse à l'état énergétique de la cellule.

Dans le muscle squelettique, BHLHB2 et BHLHB3, de part leur implication respective dans la myogenèse, pourraient ainsi participer à la régulation du phénotype musculaire en réponse aux variations du métabolisme et de la demande énergétique.

### **3. Les facteurs de transcription SREBP : bHLH particuliers**

Les facteurs de transcription SREBP ont été décrits en 1993 parallèlement par deux équipes indépendantes.

L'équipe de Bruce Spiegelman est à la recherche d'un facteur spécifique de la différenciation adipocytaire. Elle découvre alors une protéine de la famille des facteurs bHLH dont l'expression est régulée au cours de la détermination et de la différenciation des cellules adipocytaires 3T3 et capable d'activer l'expression d'un gène clé de l'adipogenèse, l'enzyme FAS (Fatty Acid Synthase). Ils nomment cette protéine ADD1 pour Adipocyte Determination and Differentiation factor 1 (Tontonoz *et al.* 1993).

De son côté, l'équipe de Joe Goldstein et Mike Brown met en évidence un motif de 10 paires de base sur le promoteur du gène du récepteur aux LDL responsable de sa régulation transcriptionnelle par les stérols désigné Sterol Response Element SRE-1 (Smith *et al.* 1990). Ils purifient alors la protéine se fixant sur ce motif et la nomment SREBP-1, pour Sterol Response Element Binding Protein 1 (Briggs *et al.* 1993; Wang *et al.* 1993).

Le clonage de l'ADNc codant pour SREBP-1 révèle l'existence d'un épissage alternatif dont résultent en fait deux protéines : SREBP-1a et SREBP-1c.

Dans un deuxième temps, l'équipe de Brown et Goldstein clone l'ADNc d'une protéine partageant 47% d'homologie avec SREBP-1, et montrant les mêmes capacités d'activation transcriptionnelle en se liant au motif SRE1. Ils nomment alors cette protéine SREBP-2 (Hua *et al.* 1993).

La famille des protéines SREBP comprend donc trois membres : SREBP-1a, SREBP-1c et SREBP-2.

### 3.1. Description, Structure, Fonction

#### 3.1.1. SREBP: bHLH-LZ particuliers

La prédiction de la séquence acide aminé de ADD1 par Tontonoz *et al.* (1993) révèle la présence au sein de la protéine d'un motif bHLH ou basic Helix-Loop-Helix et d'une région glissière à leucine ou Leucine-Zipper immédiatement adjacente à ce motif. SREBP-1 appartient donc à la famille des facteurs de transcription bHLH-LZ.

Les facteurs de transcription SREBP appartiennent donc au même groupe des bHLH-LZ que les protéines Myc/Max/Mad, mais ils se distinguent des autres bHLH par deux caractéristiques :

- premièrement, par leur spécificité de liaison aux motifs Sterol Response Element SRE
- deuxièmement, par leur synthèse sous forme de précurseur inactif lié à la membrane du réticulum endoplasmique.

Comme les autres BHLH, les protéines SREBP forment des dimères qui peuvent se lier à l'ADN au niveau de motifs E-Box CANNTG. Mais cette liaison des facteurs SREBP aux E-Box n'est possible qu'*in vitro* et n'a jamais été observée *in vivo*. SREBP se lie en fait préférentiellement sur un autre motif dit SRE pour Sterol Response Element. Ainsi, l'équipe de Bruce Spiegelman réalisa le clonage de ADD1 en se basant sur sa capacité à se lier sur le promoteur du gène de la FAS au niveau d'une E-Box (Tontonoz *et al.* 1993), mais une seconde E-box découverte sur le promoteur de FAS se révéla en fait recouvrir deux motifs SRE nécessaire à la régulation de l'expression de cette enzyme par le cholestérol (Magana and Osborne 1996).

Le motif SRE de référence est la séquence SRE 1 mise en évidence par Smith, Osborne *et al.* sur le promoteur du récepteur au LDL : ATCACCCCAC. Ce motif est également présent sur les promoteurs des gènes de la FAS et de HMG-coA réductase (Smith *et al.* 1990). Mais elle est plus ou moins conservée d'un promoteur à l'autre, SREBP pouvant reconnaître d'une façon générale les motifs de types : TCACNCCAC (Table 3) (Edwards *et al.* 2000; Osborne 2000).

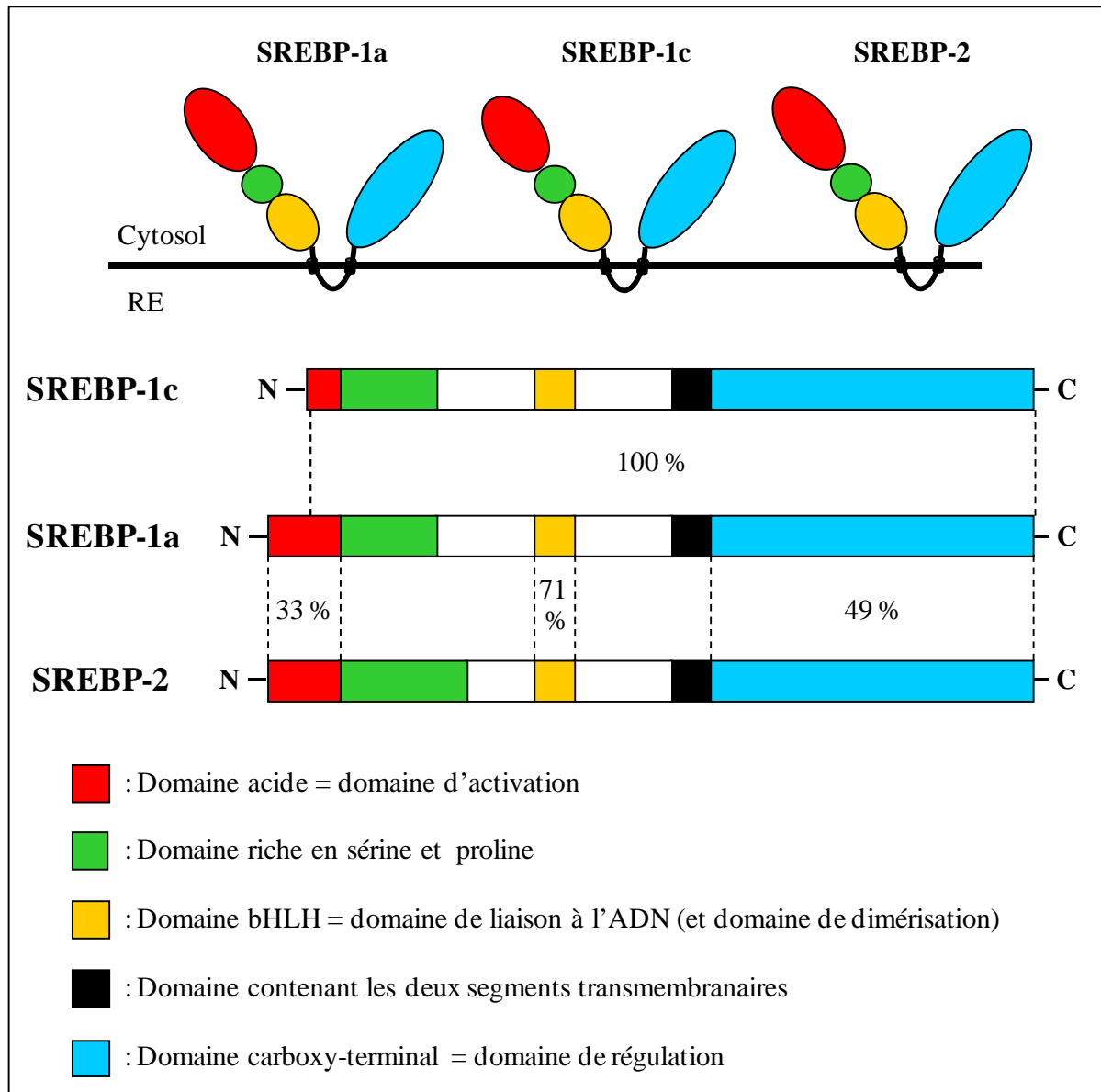
Motifs de liaison des protéines SREBP	Séquence 5'-3'	Gènes identifiés avec le consensus fonctionnel
<b>SRE-1</b>	ATCACCCCAC	HMG-coA synthase et réductase, récepteur au LDL, FAS
<b>E-Box</b>	CANNTG	L-PK, S-14
<b>SRE-3</b>	CTCACACGAG	FPP
<b>SRE-like</b>	TCAGGCTAG	ACL
<b>SRE</b> (région avec 2 sites SRE palindromiques)	TCACCC	ACC2, ME

**Table 3 : Sites consensus de liaison à l'ADN des facteurs de transcription SREBP**

C'est un simple changement d'acide aminé qui confère à SREBP cette spécificité de liaison. Dans le domaine basique de SREBP, un résidu tyrosine remplace une arginine conservée dans tous les autres bHLH (Kim *et al.* 1995). L'importance de ce résidu tyrosine a été démontrée par Kim et al (1995) qui remplaçât ce résidu tyrosine dans le domaine basique de SREBP par un résidu arginine, SREBP ne reconnaissait alors plus que les E-Box. Inversement, le remplacement du résidu arginine de USF-1 par une tyrosine permettait à cette protéine de se lier aux motifs SRE. L'observation de la structure cristalline de SREBP aux rayons X montre que le résidu tyrosine permet au domaine basique de SREBP d'adopter une conformation différente des autres bHLH permettant la reconnaissance spécifique des motifs SRE (Parraga *et al.* 1998).

Les protéines SREBP ont été purifiées pour la première fois à partir d'extrait nucléaire par chromatographie d'affinité pour l'ADN. Les protéines SREBP ainsi obtenues avaient une taille d'environ 68 kDa. Lorsque l'ADNc codant pour SREBP fut cloné, la taille de la protéine correspondante, prédite à partir de la séquence nucléique, était de 125kDa. Cette anomalie fut

expliquée par Brown, Goldstein et collaborateurs qui découvrirent que SREBP était en fait synthétisé d'abord sous forme de précurseur inactif de 1150 acides aminés retenu dans la membrane du réticulum endoplasmique (Figure 38) (Wang *et al.* 1994).



**Figure 38: Représentation schématique de la structure des protéines SREBP et de leur homologie**

d'après Shimano, 2001

Chaque pré-SREBP est organisé en trois domaines :

- un domaine N-terminal de 480 acides aminés environ, comprenant le domaine de transactivation, région riche en sérine et en proline, et le motif bHLH-LZ, domaine de dimérisation et de liaison à l'ADN (Sato *et al.* 1994).
- un domaine intermédiaire en forme d'épingle à cheveux constitué de deux segments transmembranaires hydrophobiques interrompus par une courte boucle de 30 acides aminés située dans la lumière du réticulum endoplasmique (Hua *et al.* 1995a)
- un domaine C-terminal de 590 acides aminés, dit région régulatrice car impliquée dans la régulation par les stérols de l'activation de SREBP (Hua *et al.* 1996b).

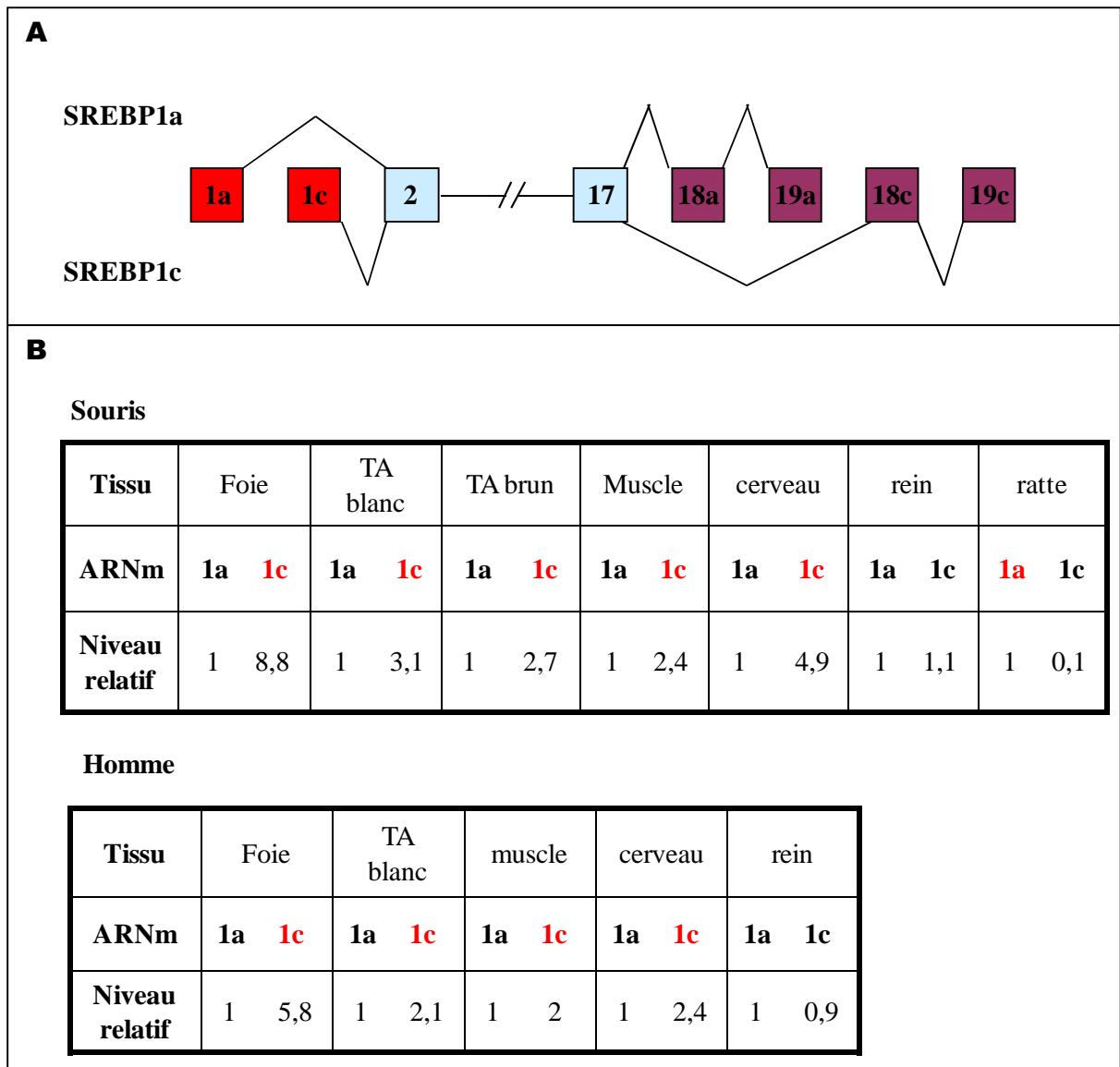
Les domaines N- et C-terminaux font face au cytosol.

Le domaine N-terminal correspond à la forme mature active de SREBP, appelée aussi forme nucléaire. Ce domaine est libéré de la membrane du réticulum endoplasmique grâce à un clivage protéique en deux étapes, puis transloqué dans le noyau où, se fixant à l'ADN au niveau de site SRE, il active l'expression de nombreux gènes cibles impliqués dans la régulation du métabolisme du cholestérol et des lipides (Brown and Goldstein 1997).

### 3.1.2. Deux gènes, trois protéines

Trois membres de la famille SREBP ont été décrits : SREBP-1a et SREBP-1c codés par un même gène *SREBF1* localisé sur le chromosome humain 17p11.2 et SREBP-2 codé par un second gène *SREBF2* localisé sur le chromosome humain 22q13 (Hua *et al.* 1995b). Le gène *SREBF1* couvre 26 kb et encode 22 exons et 20 introns. Le gène *SREBF2* couvre 72 kb et contient 19 exons et 18 introns (Miserez *et al.* 1997).

Le clonage de *SREBF1* à partir de cellules humaines HELA produisit plusieurs ADNc se différenciant par leurs extrémités 5' et 3' (Yokoyama *et al.* 1993). Les deux différentes séquences furent dénommées "a" et "c", l'ADNc contenant les séquences "a", SREBP-1a et l'ADNc contenant les séquences "c", SREBP-1c. Ces deux isoformes sont les résultantes d'épissages alternatifs successifs, mettant en jeu les exons 1, 18 et 19. La séquence "a" est codée par les exons 1a, 18a et 19a. La séquence "c" est codée par les exons 1c, 18c et 19c. Leur expression est sous le contrôle de deux promoteurs différents produisant deux transcrits contenant soit l'exon 1a soit l'exon 1c, relié au cours de l'épissage à l'exon 2, commun aux deux isoformes. Les exons 2 à 17 codent pour les deux SREBP-1 (Figure 39 A).



**Figure 39** : Représentation schématique de l'épissage alternatif conduisant à l'expression des deux isoformes de SREBP-1 et leur répartition tissulaire

d'après Hua *et al.* 1995 ; Shimomura *et al.* 1997

Les deux protéines SREBP-1a et SREBP-1c sont donc presque identiques mais diffèrent de quelques acides aminés à leur extrémité N-terminale, codés par l'exon 1. Il en résulte une différence dans leur capacité d'activation transcriptionnelle.

L'exon 1a code une séquence de 24 acides aminés, dont 8 sont chargés négativement. Cette séquence, à laquelle participent 4 acides aminés chargés négativement de l'exon 2, constitue une forte région transactivatrice de 42 acides aminés. Ce domaine confère à SREBP-1a un fort pouvoir d'activation transcriptionnelle.

L'exon 1c, quant à lui, ne code que 5 acides aminés, dont un seul chargé négativement. La région transactivatrice de SREBP-1c est donc beaucoup plus courte. SREBP-1c apparaît

ainsi comme un activateur transcriptionnel bien plus faible que SREBP-1a, *in vitro* comme *in vivo* (Shimano *et al.* 1997a; Amemiya-Kudo *et al.* 2002).

Le niveau relatif d'expression de SREBP-1a et SREBP-1c sont très différents d'un tissu à l'autre (Figure 39 B). Chez l'homme et la souris, SREBP-1c est l'isoforme majoritaire dans la plupart des tissus avec notamment des ratios 1c/1a de 3 dans les adipocytes, 5 dans le cerveau et presque 10 dans le foie. A l'extrême opposé, SREBP-1a est 10 fois plus abondant que SREBP-1c dans la rate et 5 fois plus dans l'intestin, deux tissus ayant un fort taux de prolifération cellulaire. Le niveau d'expression de SREBP-1a est également particulièrement élevé dans les cellules en culture (Shimomura *et al.* 1997). Ainsi, l'isoforme SREBP-1a, plus active transcriptionnellement que SREBP-1c, serait préférentiellement exprimée dans les tissus où la demande en cholestérol est la plus forte, notamment durant les périodes de prolifération cellulaire intense (Osborne 2000).

### **3.1.3. Du précurseur à la forme nucléaire**

Après leur synthèse, les protéines SREBP restent liées à la membrane du réticulum endoplasmique (RE) sous forme de précurseurs inactifs. Les mécanismes moléculaires conduisant au clivage de la forme mature de SREBP ont été largement décrits par Goldstein et Brown (Wang *et al.* 1994; Sakai *et al.* 1996; Brown and Goldstein 1997; Brown and Goldstein 1999; Radhakrishnan *et al.* 2008). Ces mécanismes sont régulés de façon stérol-dépendante. Quand les cellules subissent une déplétion en stérols, l'extrémité N-terminale du précurseur est clivée, libérant la forme active de SREBP qui gagne le noyau cellulaire pour activer la transcription ces gènes cibles (Figure 40) (Sato *et al.* 1994; Wang *et al.* 1994; Hua *et al.* 1996a).

#### **a) SCAP : escorte de SREBP du RE au Golgi**

Immédiatement après leur synthèse dans la membrane du RE, SREBP se lie à la protéine SCAP, SREBP cleavage-activating protein (Figure 40). SCAP est une protéine membranaire polytopique constituée d'un domaine N-terminal organisé en 8 domaines transmembranaires (TM) enchâssés dans la membrane du RE, et d'un domaine C-terminal cytoplasmique incluant des motifs WD (Tryptophane-Aspartame) interagissant avec le domaine régulateur C-terminal de SREBP (Sakai *et al.* 1997; Nohturfft *et al.* 1998b). SCAP



fonctionne comme un senseur du niveau de cholestérol intramembranaire et comme protéine cargo escortant SREBP du RE à l'appareil de Golgi où se produit le clivage. Les stérols bloquent le complexe SCAP-SREBP dans la membrane du RE par interaction directe sur le domaine N-terminal de SCAP au niveau d'un domaine SSD, Sterol-Sensing Domain (Nohturfft *et al.* 1998a; Nohturfft *et al.* 1999; Yang *et al.* 2000). Le domaine SSD est un segment de 170 acides aminés situé sur les TM 2 à 6, également retrouvé sur d'autres protéines répondant au cholestérol comme la HMG-CoA réductase, enzyme limitante de la synthèse de cholestérol (Lange and Steck 1998; Goldstein *et al.* 2006).

En absence de cholestérol, le complexe SCAP-SREBP est incorporé au sein de vésicules à COPII et transporté vers l'appareil de Golgi. La formation des vésicules est initiée par la petite protéine G Sar1 qui se lie à la membrane du RE en hydrolysant une molécule de GTP. Sar1 recrute à la membrane le dimère Sec23/24. Sec24 se lie alors à SCAP via une séquence hexapeptidique MELADL, situé sur la boucle cytoplasmique reliant entre les TM 6 et 7 (Figure 40) (Espenshade *et al.* 2002; Sun *et al.* 2005). Après libération du fragment terminal de SREBP par clivage dans l'appareil de Golgi, SCAP est recyclée dans le RE.

#### **b) Insig : rétention de SREBP au sein du RE**

Quand le niveau de cholestérol membranaire augmente, les stérols se fixent sur SCAP provoquant un changement de conformation, favorisant la liaison de SCAP aux protéines INSIG, Insulin-induced gene, INSIG-1 et INSIG2 (Figure 40) (Peng *et al.* 1997 ; Brown *et al.* 2002; Yabe *et al.* 2002; Adams *et al.* 2003; Feramisco *et al.* 2005 ). Ces deux protéines ont été décrites pour empêcher le passage de SREBP dans l'appareil de Golgi en se liant à SCAP au niveau du domaine transmembranaire TM6 (Yang *et al.* 2002; Feramisco *et al.* 2004). Cette liaison entraînerait un changement de position du segment MELADL au sein de la protéine SCAP, le rendant inaccessible aux protéines COPII (Sun *et al.* 2005; Sun *et al.* 2007b). Les protéines Insig favorisent donc la rétention par les stérols de SREBP dans le RE. En cas de déplétion en cholestérol, SCAP subit un changement conformationnel induisant sa dissociation des protéines Insig, qui sont alors ubiquitinées puis dégradées par le protéasome (Figure 40) (Sever *et al.* 2003).

### c) S1P, S2P : clivage protéolytique de SREBP

Une chute du cholestérol intramembranaire entraîne donc le passage du complexe SCAP-SREBP dans l'appareil de Golgi, où nSREBP est libéré à la suite d'un clivage protéolytique en deux étapes (Wang *et al.* 1994; Sakai *et al.* 1996).

Le processus de clivage est engagé par une sérine protéase dite S1P pour Site-1 Protease (Duncan *et al.* 1997). Le premier clivage, inhibé par les stéroïdes, a lieu dans la boucle hydrophile se projetant dans la lumière du RE (site 1). Ce clivage sépare SREBP en deux fragments qui restent reliés dans la membrane. Cette protéolyse requiert l'interaction de S1P avec la protéine SCAP. Cette interaction est régulée par les stéroïdes (Sakai *et al.* 1998). Une deuxième protéase, S2P, Site-2 Protease, clive alors le fragment N-terminal lié à la membrane au sein du domaine N-terminal (Duncan *et al.* 1998). Ce deuxième clivage n'est pas régulé par les stéroïdes mais ne peut s'effectuer qu'après le clivage du site-1 (Figure 40) (Brown and Goldstein 1999).

Ce mécanisme de régulation protéolytique, appelé RIP, Regulated Intramembrane Proteolysis, permettant la libération de protéines membranaires transcriptionnellement actives, a été décrit dans les cellules animales comme dans les bactéries. Outre le métabolisme lipidique, il intervient dans diverses fonctions physiologiques telles que la différenciation cellulaire, et la réponse UPR, Unfolded Protein Response (Brown *et al.* 2000).

La régulation par les stéroïdes n'est pas la seule s'exerçant sur la protéolyse de SREBP. La première protéase clivant SREBP fut clonée et purifiée à partir de cellules CHO, et nommée SCA 1 pour SREBP Cleavage Activity. SCA-1 se révéla être en fait l'homologue chez le hamster de la cystéine protéase CPP32, ou Caspase 3 (Wang *et al.* 1995b; Wang *et al.* 1996b). De la même manière, SCA-2 fut purifiée et se révéla être l'homologue de MhC3 ou Caspase 7 (Pai *et al.* 1996).

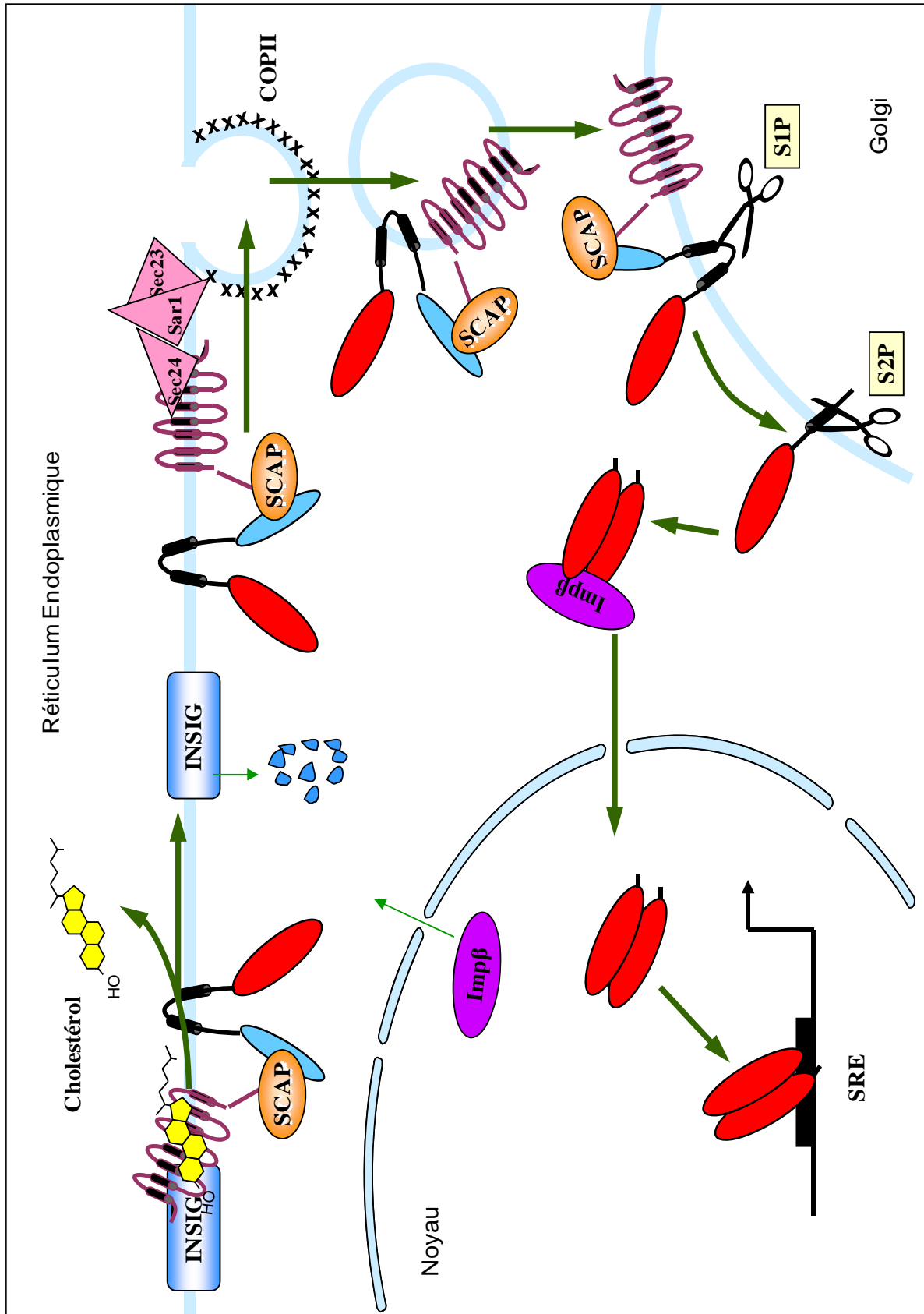
Ainsi, le processus de maturation de SREBP peut-être induit par l'apoptose, en dehors de toute régulation par les stéroïdes. Les caspases activées clivent l'extrémité NH<sub>2</sub> terminale de SREBP au niveau d'un site différent de S1P et S2P pour libérer un fragment de 460 acides aminés capable d'activer la transcription des gènes cibles de SREBP. Cette activation de SREBP par les caspases induisant l'expression des gènes lipogéniques, est un des phénomènes les plus précoces du programme apoptotique (Higgins and Ioannou 2001).

Récemment, les caspases 2 et 7 ont été décrites comme gènes cibles de SREBP-1 et 2 (Logette *et al.* 2005; Gibot *et al.* 2009), suggérant la mise en place d'un rétrocontrôle positif. Ainsi, SREBP pourrait être un acteur à part entière du programme apoptotique.

#### **d) Importines $\beta$ : import nucléaire**

Des expériences *in vitro* et *in vivo* montrent que SREBP-2 est importé dans le noyau via une interaction directe avec l'importine $\beta$ . Les importines  $\beta$  sont des récepteurs solubles se liant aux protéines porteuses d'une séquence signal NLS, Nuclear Localization Signal (Nagoshi *et al.* 1999). L'analyse de la structure cristallographique du complexe importine  $\beta$ -SREBP-2 montre que SREBP-2 est transporté dans le noyau sous forme de dimère (Figure 40) (Lee *et al.* 2003b). La mutation du domaine LZ diminue fortement la dimérisation et l'import nucléaire de SREBP-2 (Nagoshi and Yoneda 2001). SREBP-2 ayant une très forte tendance à dimériser même à très basse concentration, il est probable que les précurseurs de SREBP-2 forment des homodimères alors qu'ils sont encore ancrés dans la membrane endoplasmique. L'importine  $\beta$  reconnaît alors directement le domaine HLH-LZ dimérisé des précurseurs, ce qui permettrait un transport nucléaire immédiat du dimère actif de SREBP-2 après le clivage (Lee *et al.* 2003a). Ainsi, SREBP-2 sous forme de dimère peut directement se lier au motif SRE de ses gènes cibles.

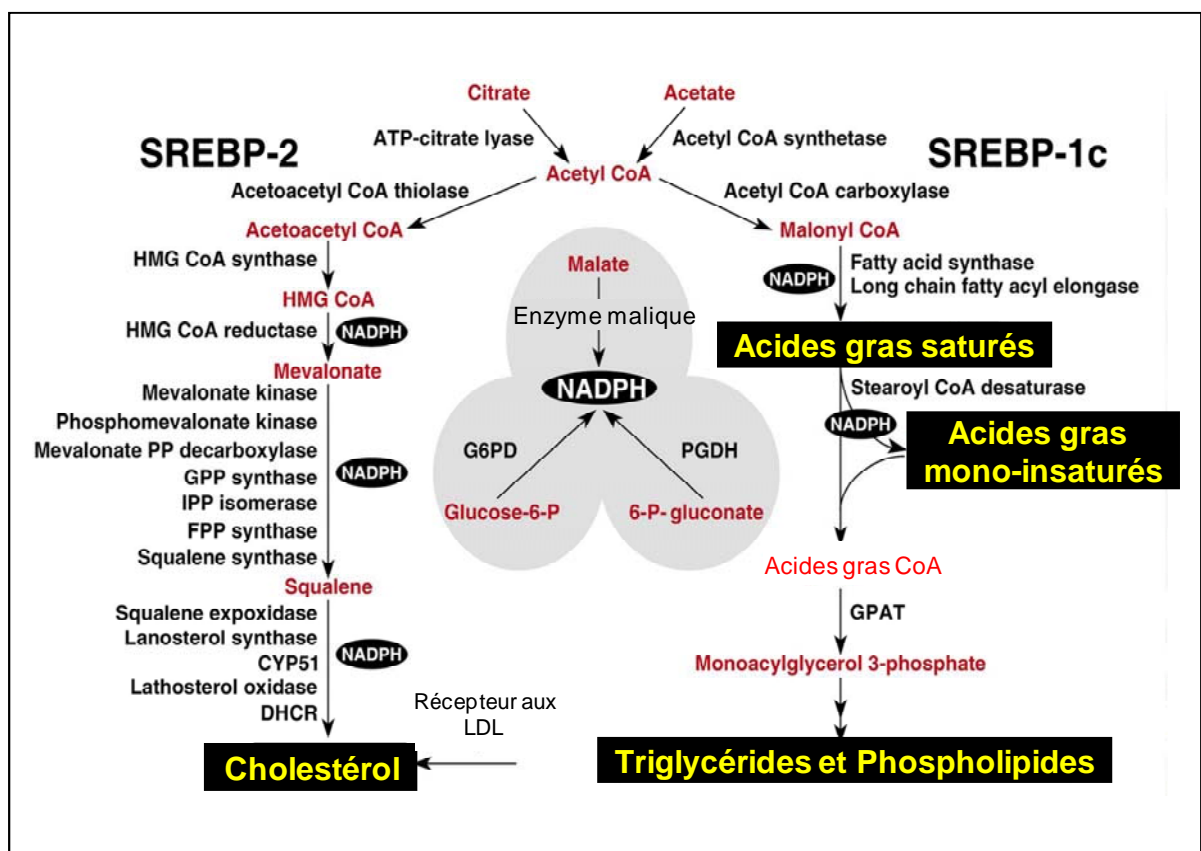
Si seul le transport nucléaire de SREBP-2 a été aussi bien caractérisé, une étude montre que SREBP-1c est également transporté dans le noyau grâce à une interaction directe avec l'importine  $\beta$  (Guillemain *et al.* 2004). La forte homologie entre les domaines HLH-LZ de SREBP-2, SREBP-1c et SREBP-1a, suggère un mécanisme d'import nucléaire identique pour les trois isoformes.



**Figure 40:** Processus de maturation de SREBP et régulation par les stérols

### 3.1.4. SREBP : régulateurs clé du métabolisme lipidique

Des études *in vitro* et *in vivo* montrent que les facteurs de transcription SREBP sont fondamentalement impliqués dans l'homéostasie du cholestérol et la lipogenèse (Horton 2002c; Horton *et al.* 2002ba; Horton *et al.* 2002ab). Outre le récepteur au LDL, ils régulent l'expression de plus de trente gènes nécessaires à la synthèse endogène du cholestérol, des acides gras, des triglycérides et des phospholipides (Horton *et al.* 2003a). Exprimés de façon supra-physiologique, les trois isoformes de SREBP sont capables d'activer à la fois les enzymes cholestérogéniques et lipogéniques (Figure 41).



**Figure 41:** Gènes et voies métaboliques régulés par les facteurs SREBP

d'après Horton *et al.* 2002

Cependant, malgré leur forte identité, leur mécanisme commun de maturation et de reconnaissance de l'ADN, chaque isoforme de SREBP semble avoir des fonctions spécifiques. Le développement de souris transgéniques a permis de démontrer les rôles respectifs joués par chacune des isoformes (Table 4).

Manipulation	Niveaux d'expression de SREBP	Synthèse de cholestérol	Synthèse d'acides gras	Foie	Plasma
<b>souris KO</b>					
SREBP-1	↓ 1a, ↓ 1c, ↑ 2	↑↑↑	↓ 40%	x 3 cholestérol	↓ cholestérol/triglycérides
SREBP-1c	↓ 1a, ↓ 1c, ↑ 2	↑	↓ 50%	x 3 cholestérol	↓ triglycérides
SREBP-2	létal	—	—	—	—
S1P	létal	—	—	—	—
<b>souris transgéniques</b>					
SREBP-1a	↑ 1a	x 5	x 26	x 6 cholestérol	↓ cholestérol ↓↓ triglycérides
SREBP-1c	↑ 1c		x 4	x 22 triglycérides	↓ triglycérides
SREBP-2	↑ 2	x 28	x 4	x 4 triglycérides x 3 cholestérol	↓ triglycérides ←→ cholestérol
SCAP	↑ 1a, 1c, 2	x 5	x 2	x 4 triglycérides x 6 cholestérol	↓ triglycérides ↓ cholestérol
<b>KO spécifiques foie</b>					
SCAP	↓ 1a, 1c, 2	↓↓↓	↓↓↓	x 9 triglycérides	↓ triglycérides
S1P	↓ 1a, 1c, 2	↓↓↓	↓↓↓		↓

↑ : augmentation ; ↑↑↑ : forte augmentation ; ↓ : diminution ; ↓↓↓ : forte diminution ; ←→ : pas de variation.

**Table 4 : Altérations du métabolisme lipidique dans différents modèles de souris génétiquement modifiées pour SREBP**

d'après Mac Pherson *et al.* 2004

Les souris invalidées pour toutes les isoformes de SREBP meurent très tôt au cours du développement embryonnaire (Table 4). Notamment, la délétion totale de *s1p*, empêchant la maturation des trois SREBP, provoque la mort des embryons après seulement quatre jours de développement (Yang *et al.* 2001). De la même façon, la délétion totale de *sreb2* est complètement létale après 8 jours de développement embryonnaire. Par contre, le Knockout de *sreb1* n'est que partiellement létal, et 15 à 45% des souris survivent. De façon surprenante, ces souris déficientes en SREBP-1-a et SREBP-1c présentent une synthèse de cholestérol accrue, dû à une augmentation compensatrice de SREBP-2 (Shimano *et al.* 1997b).

La délétion totale des SREBP étant létale, des Knockout conditionnels permettant la suppression dans le foie des gènes codant pour les protéines SCAP et S1P ont été mis au point. Ces Knockout conditionnels induisent une réduction drastique des niveaux de SREBP-1 et 2 nucléaires. Il en résulte un effondrement de l'expression des enzymes cholestérogéniques et lipogéniques, et une diminution de 80% de la synthèse hépatique de cholestérol et acides gras (Matsuda *et al.* 2001; Yang *et al.* 2001).

Afin d'étudier le rôle respectif de chaque isoforme de SREBP, des souris transgéniques surexprimant la forme nucléaire de SREBP-1a, SREBP-1c ou SREBP-2 ont été créées (Table 4).

La surexpression de nSREBP-1a dans le foie des souris, augmente l'expression des gènes impliqués dans la synthèse du cholestérol comme la HMG-CoA (3-hydroxy-3-méthylglutaryl-Co-enzyme A ) synthase , la HMG-CoA réductase et la squalène synthase ; et de façon encore plus remarquable, les gènes impliqués dans la lipogénèse, notamment la FAS (Fatty Acide Synthase), la SCD1 ( Stearoyl-CoA-Desaturase 1) et la GPAT ( Glycerol 3-Phosphate acetyl transferase). L'activation préférentielle de la synthèse d'acides gras, 26 fois augmentée, par rapport à celle du cholestérol, multipliée par quatre, provoque une accumulation très importante de triglycéride dans le foie de ces souris, entraînant une stéatose (Shimano *et al.* 1996; Horton *et al.* 2003b).

La surexpression de SREBP-1c induit une augmentation de 6 fois de la synthèse d'acides gras, mais n'a aucun effet sur la synthèse de cholestérol. SREBP-1c active l'expression des mêmes gènes lipogéniques que SREBP-1a, mais de façon plus faible. SREBP-1a est un activateur transcriptionnel très puissant, grâce à son domaine transactivateur plus long, mais il est très faiblement exprimé dans les tissus. Cette observation suggère que SREBP-1a pourrait être responsable du maintien de l'activité basale de synthèse de

cholestérol et acides gras (McPherson and Gauthier 2004). SREBP-1c possède un domaine transactivateur moins puissant mais il est exprimé de façon plus forte dans les tissus et active de façon plus spécifique les gènes codant pour les enzymes de la lipogénèse.

En plus des gènes lipogéniques, SREBP-1c est capable d'activer l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme glucidique comme la Glucokinase dans le foie (Foretz *et al.* 1999a) et l'Hexokinase II HKII dans le muscle squelettique (Gosmain *et al.* 2004; Gosmain *et al.* 2005).

La surexpression de SREBP-2 dans le foie de souris induit préférentiellement et très fortement les gènes impliqués dans la synthèse du cholestérol, avec notamment une augmentation de 75 fois du niveau d'ARNm codant pour la HMG-CoA réductase. Les gènes lipogéniques sont également activés mais dans une moindre mesure. Ainsi, le taux de synthèse de cholestérol dans le foie de ces souris transgéniques augmente de 28 fois alors que la synthèse d'acides gras n'est multipliée que par quatre.

Enfin, les trois isoformes SREBP activent l'expression des deux enzymes impliquées dans la production d'Acetyl-CoA, précurseur des acides-gras et du cholestérol. SREBP-2 et SREBP-1c active également l'expression de gènes impliqués dans la génération du NADPH, cofacteur indispensable à la synthèse lipidique (Eberle *et al.* 2004).

Ainsi, les trois isoformes de SREBP, bien que toutes impliquées dans l'homéostasie lipidique, jouent des rôles distincts : SREBP-1 active préférentiellement les gènes impliqués dans la lipogénèse alors que SREBP-2 active plus spécifiquement les gènes impliqués dans la synthèse de cholestérol.

Ces différentes fonctions de SREBP pourraient résulter d'une différence d'affinité pour les promoteurs des gènes cibles. Les promoteurs de tous les gènes cholestérogéniques cible de SREBP connus à ce jour, contiennent une séquence SRE classique, identique à celle mise en évidence pour le récepteur au LDL, alors que le promoteur des gènes lipogéniques contiennent des séquences dite SRE-like, similaire mais non exactement identique à SRE-1. Des expériences de transfections cellulaires ont montré des affinités différentes de SREBP-1a, SREBP-1c et SREBP-2 pour les promoteurs contenant des SRE ou des E-Box. En résumé, SREBP-1a et SREBP-2 activent efficacement les promoteurs contenant les SRE alors que SREBP-1c est inactif sur ces promoteurs. Au contraire, SREBP-1a et SREBP-1c se lient efficacement sur les motifs E-Box, alors que SREBP-2 en est incapable. Les trois protéines



reconnaissent les séquences SRE-like sur les gènes lipogéniques mais avec différentes efficacités (Shimano 2001; Amemiya-Kudo *et al.* 2002).

Cette différence d'affinité expliquerait la plus grande spécificité de SREBP-2 pour les gènes cholestérogéniques et de SREBP-1c pour les gènes lipogéniques, SREBP-1a pouvant activer les deux voies métaboliques.

### **3.1.5. Régulation de l'activité transcriptionnelle de SREBP**

Comme de nombreux autres, les facteurs de transcription SREBP sont de faibles activateurs transcriptionnels par eux-mêmes. Ils doivent donc recruter des cofacteurs qui stabilisent leur liaison à l'ADN et potentialisent leur effet via des modifications chromatinienne et le recrutement de la machinerie basale de transcription.

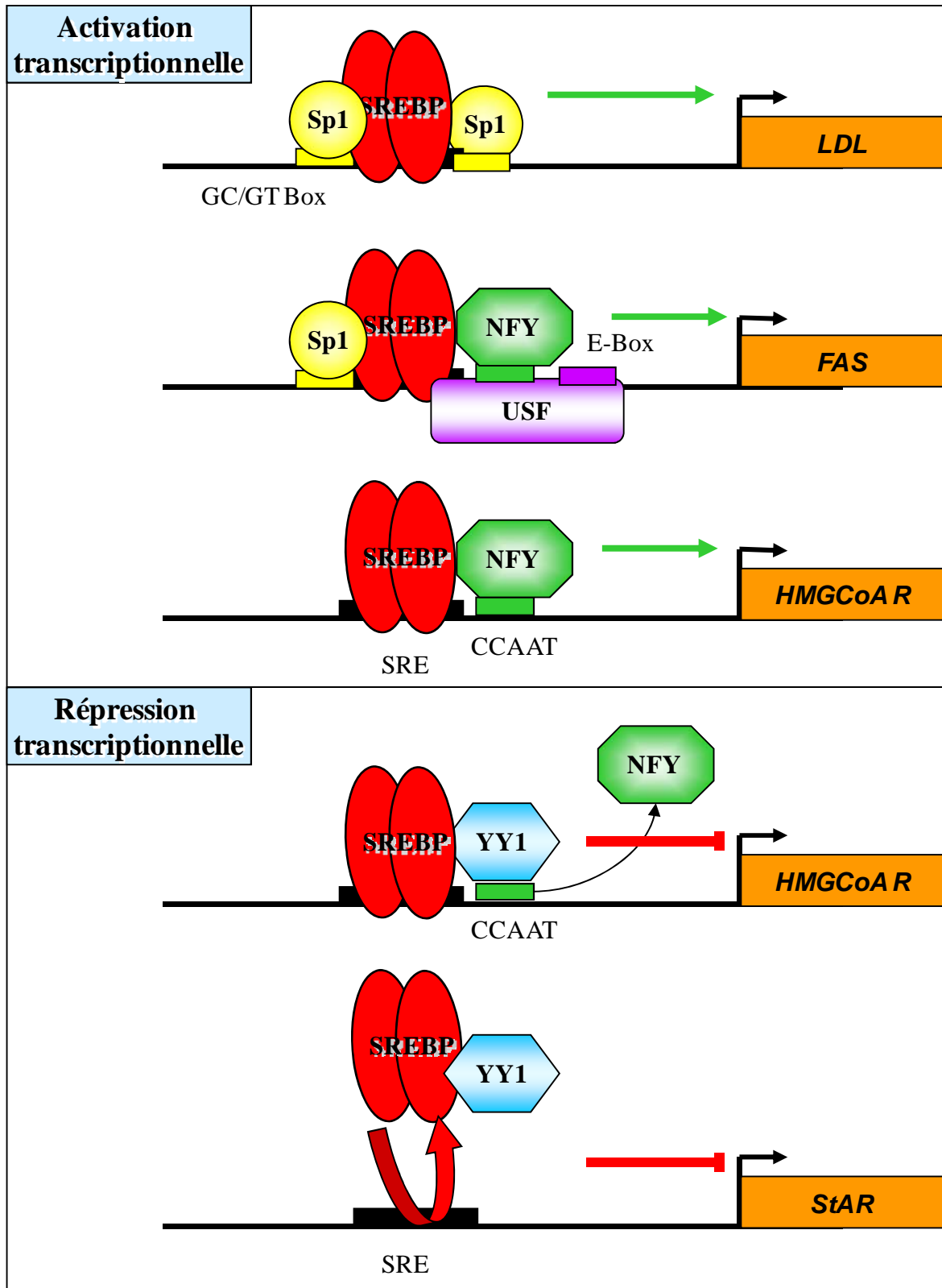
De nombreuses protéines nucléaires agissant comme modulateurs de l'activité de SREBP ont été identifiées, parmi elles, des co-activateurs comme CREB-Binding Protein, CBP, Sp1, NFY et des co-répresseurs, comme YY1 (Figure 42) (Shimano 2001; Sato 2009).

Le premier co-activateur décrit pour interagir avec SREBP est Sp1. La régulation par les stérols du gène du récepteur au LDL requiert la présence sur le promoteur de ce gène de deux motifs, le motif SRE et deux motifs de liaison à Sp1, situés de part et d'autre du SRE (Figure 42) (Sanchez *et al.* 1995; Yieh *et al.* 1995). Sp1, en se liant à SREBP-1a, potentialise sa fixation à l'ADN (Bennett and Osborne 2000). SREBP-1a coopère avec Sp1 également pour réguler la transcription des gènes de la FAS, ACC2, Acetyl-CoA carboxylase 2, et ACS1, Acetyl-CoA synthétase 1 (Bennett *et al.* 1995; Lopez *et al.* 1996; Xiong *et al.* 2000; Ikeda *et al.* 2001).

Parmi les séquences associées aux motifs SRE sur les promoteurs des gènes cibles de SREBP, on retrouve fréquemment CCAAT, le motif de liaison du co-activateur CBF/NFY, CCAAT-binding factor/nuclear factor-Y. Ce motif est présent dans la zone de réponse aux stérols des promoteurs, notamment, des gènes de la FPP, Farnesyl diphosphate synthase, HMG-CoA réductase, FAS, ACC (Dooley *et al.* 1998; Jackson *et al.* 1998; Magana *et al.* 2000). Sur ces promoteurs, la liaison de NFY sur son site CCAAT est nécessaire à la liaison de SREBP-1 au niveau du SRE (Jackson *et al.* 1998).

Sur certains promoteurs, dont celui de *FAS*, SREBP interagit physiquement à la fois avec Sp1 et NFY pour former un complexe activateur permettant le recrutement de la

machinerie de transcription (Figure 42) (Bennett and Osborne 2000; Magana *et al.* 2000; Xiong *et al.* 2000).



**Figure 42: Régulation de l'activité transcriptionnelle de SREBP-1**

d'après Shimano, 2001

Une étude récente, basée sur une approche par CHIP on chip, révèle un vaste réseau de régulation génique impliquant SREBP-1, Sp1 et NFY (Reed *et al.* 2008). Ainsi, près de la moitié des gènes cible de SREBP-1 lie au moins un des deux cofacteurs. De plus, différentes combinaisons de ces trois facteurs peuvent activer différents sets de gène en fonction de leur rôle biologique. Ainsi, les gènes impliqués dans la lipogenèse, comme SCD1, sont préférentiellement activés par SREBP-1 et NFY. Alors que la transcription des gènes impliqués dans la synthèse du cholestérol requiert les trois cofacteurs à la fois. Au contraire, les gènes cibles de SREBP-1 impliqués dans le métabolisme glucidique ne lient ni NFY, ni Sp1, suggérant la mise en jeu de co-activateurs différents. D'autre part, Magana *et al.* (Magana *et al.* 2000) montrent que suivant le stimulus, les cofacteurs recrutés sur le promoteur de la FAS par SREBP sont différents. Ainsi, la régulation par les stéroïdes nécessite le recrutement de SREBP et NFY, alors que l'activation par les hydrates de carbone implique le recrutement de SREBP, NFY et de Sp1.

D'autres cofacteurs interagissant avec SREBP, viennent élargir les possibilités de régulations géniques.

CBP, CREBP-Binding Protein, se lie à la région N-terminale de SREBP-1. CBP possède une activité acétyltransferase dirigée contre les histones, lui permettant d'altérer la structure de la chromatine afin d'en faciliter l'accès à la machinerie de transcription (Oliner *et al.* 1996).

Le complexe ARC, activator-recruited co-factor, encore appelé DRIP, vitamine D receptor interacting protein, interagit avec SREBP via la sous-unité ARC-105, au niveau du même motif que CBP. ARC est un large complexe de plusieurs cofacteurs associés à l'ARN polymérase II (Naar *et al.* 1999; Toth *et al.* 2004).

En comparaison avec SREBP-1a, SREBP-1c ne lie que très faiblement CBP et ARC105, à cause de son domaine N-terminal plus court. Ceci explique en partie la faible activité transcriptionnelle de SREBP-1c par rapport à SREBP-1a.

USF, Upstream Stimulatory Factor, un facteur de la famille bHLH-LZ et SREBP interagissent via leur domaine HLH, pour activer de manière synergique la transcription des gènes *FAS* et de *GPAT*, codant pour la Glycerol 3-phosphate acetyl transférase (Figure 42) (Griffin *et al.* 2007).

PGC1 $\beta$  de la famille des cofacteurs PGC1, proliferator-activated receptor-coactivator 1, particulièrement impliqués dans le contrôle du métabolisme hépatique, interagit avec les facteurs SREBP pour induire les mécanismes de la lipogenèse et de la sécrétion des lipoprotéines (Lin *et al.* 2005).

Enfin, l'activation par SREBP de certains gènes cibles peut être réprimée par le facteur YY1, Yin Yang 1. YY1 réprime l'expression de la HMG-CoA synthase, FPP synthase et du récepteur au LDL en déplaçant sur le promoteur de leur gène le facteur NFY, nécessaire à son activation transcriptionnelle (Bennett *et al.* 1999; Ericsson *et al.* 1999). Un autre mécanisme serait impliqué dans la répression des gènes de la StAR, steroidogenic acute regulatory protein et du récepteur aux HDL : en se liant avec une très forte affinité à SREBP-1a, YY1 empêcherait ce dernier de se fixer au niveau des motifs SRE (Figure 42) (Christenson *et al.* 2001; Shea-Eaton *et al.* 2001).

De cette façon, le recrutement de différentes combinaisons de cofacteurs et partenaires transcriptionnels permet à SREBP de réguler différents sets de gènes en réponse à divers stimuli.

### **3.2. Les facteurs SREBP dans le muscle squelettique**

Les facteurs de transcription SREBP jouent un rôle majeur dans la régulation de la synthèse lipidique et du stockage lipidique. Ils activent la transcription de nombreuses enzymes de la lipogenèse. Ils sont donc très exprimés dans le foie et le tissu adipeux, organes à forte capacité lipogénique. Le muscle squelettique n'est pas considéré comme un organe hautement lipogénique. Pourtant, son métabolisme lipidique est très actif : c'est un site majeur d'oxydation des acides gras et de stockage de triglycérides. Si la fonction des facteurs SREBP a été largement décrit dans le foie et le tissu adipeux, peu de choses encore sont connues sur son rôle dans le muscle squelettique. SREBP-1 est pourtant exprimé dans le muscle squelettique murin et humain à des niveaux parfois proches de ceux observés dans le foie (Shimomura *et al.* 1997; Ducluzeau *et al.* 2001). Comme dans la majorité des organes, SREBP-1c est l'isoforme majoritaire présente dans le muscle. Cependant, le niveau d'expression des isoformes de SREBP-1 varie en fonction du type de fibres musculaires dont est composé le muscle. Chez le rat, l'expression de SREBP-1c est de 8 à 30 fois supérieure à SREBP-1a, elle est très forte dans le Gluteus, muscle composé majoritairement de fibres

glycolytiques rapides et beaucoup plus faible dans le Soleus, muscle composé de fibres oxydatives lentes (Guillet-Deniau *et al.* 2002).

### 3.2.1. Régulations nutritionnelles de SREBP-1 dans le muscle

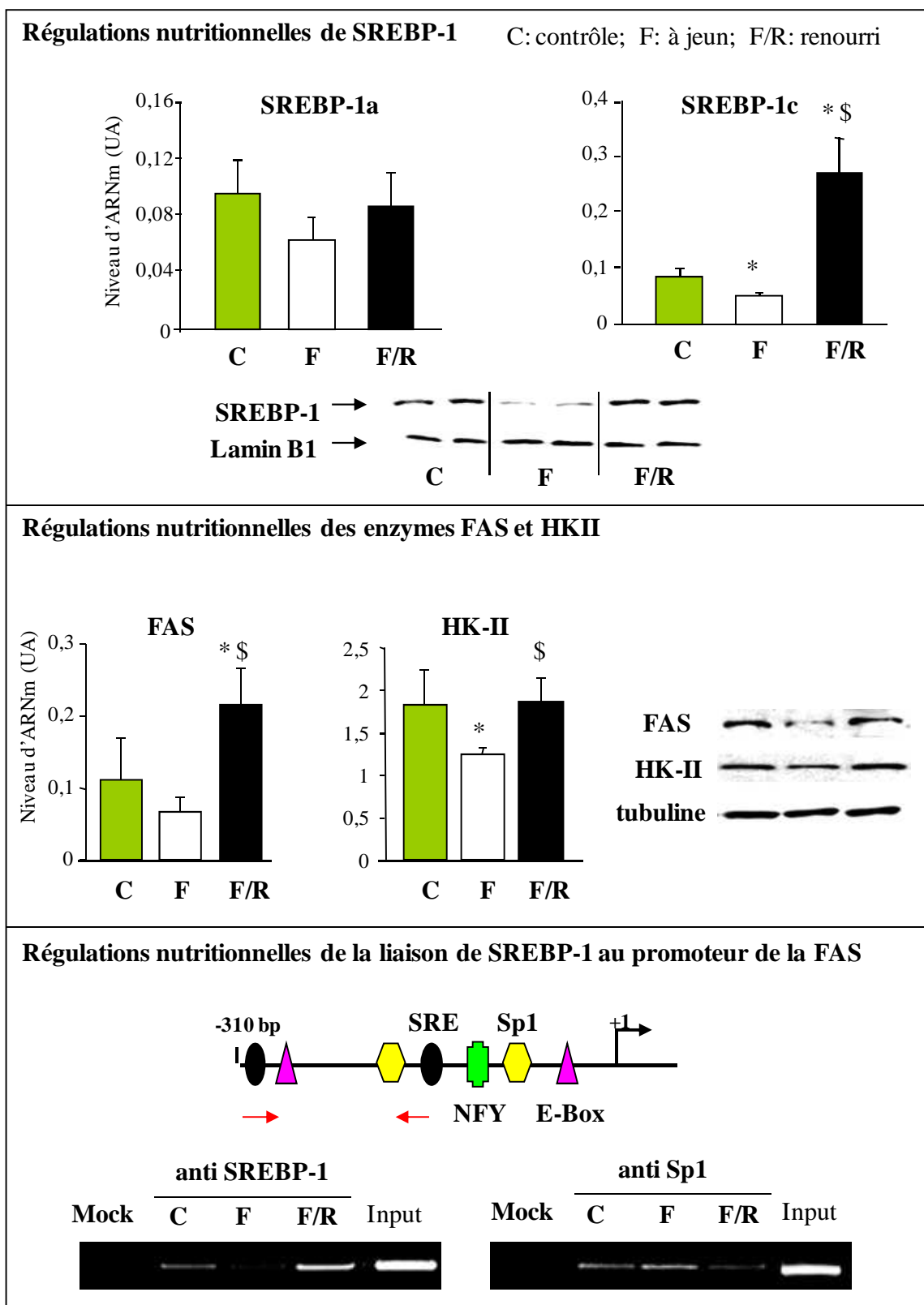
#### a) Effet du statut nutritionnel

Outre la régulation du processus de maturation, SREBP est fortement régulé au niveau transcriptionnel. Cette régulation transcriptionnelle se porte essentiellement sur SREBP-1c, SREBP-1a et SREBP-2 étant exprimés à faible niveau et de façon constitutionnelle dans la plupart des organes.

La première observation d'une régulation transcriptionnelle de SREBP-1c *in vivo* se fait à la suite de protocoles alimentaires dans le cadre desquels des rats sont mis à jeun 24 ou 48h puis renourris. Ces changements de statuts nutritionnels régulent l'expression de SREBP-1c dans le foie, dans le tissu adipeux et dans le muscle squelettique (Horton *et al.* 1998; Kim *et al.* 1998a; Bizeau *et al.* 2003).

Un jeûne de 48h provoque une diminution drastique du niveau en ARNm de SREBP-1c dans le muscle squelettique de rat. La diminution la plus forte se produit après 24h de jeûne. Dans le muscle des rats renourris, l'expression de SREBP-1c est fortement stimulée dès 3h de libre accès à la nourriture, un pic étant atteint après 12h. L'expression protéique de SREBP-1c suit les niveaux d'ARNm, la quantité de précurseur comme la quantité de SREBP-1c nucléaire diminue pendant le jeûne et augmente de 2 à 4 fois lors de la réalimentation. Par contre aucune variation de SREBP-1a n'est observée en réponse au statut nutritionnel, ni au niveau ARNm ni au niveau protéique (Bizeau *et al.* 2003; Commerford *et al.* 2004; Gosmain *et al.* 2005; Kamei *et al.* 2008). *In vivo*, SREBP-1c semble être la seule isoforme sensible à l'état nutritionnel dans le muscle squelettique, comme précédemment observé dans le foie et le tissu adipeux (Figure 43) (Horton *et al.* 1998; Kim *et al.* 1998).

Cette réponse de SREBP-1c au statut nutritionnel est identique quelque soit la composition en fibres du muscle. Démontrée chez l'animal, cette régulation postprandiale de l'expression de SREBP-1c est également observée dans le muscle squelettique humain (Tsintzas *et al.* 2006). SREBP-1c se comporte donc comme un senseur du statut énergétique du muscle squelettique.



**Figure 43 : Régulation de l'expression et l'activité transcriptionnelle de SREBP-1 en réponse aux variations nutritionnelles dans le muscle de rat**

d'après Gosmain *et al.* 2005

Les variations d'expression de SREBP-1c en réponse aux changements nutritionnels, s'accompagnent de variations dans l'expression de plusieurs de ses gènes cibles (Figure 43). Ainsi, au cours du jeûne, l'expression de la FAS et de HKII dans le muscle squelettique s'écroule (Gosmain *et al.* 2005), alors que l'expression de UCP3, Uncoupling protein 3, protéine spécifique du muscle impliquée dans le découplage énergétique, augmente (Tunstall *et al.* 2002a). L'expression de la FAS, d'ACC1 et de HKII augmente clairement au cours de la réalimentation, alors que l'expression d'UCP3 diminue. Ces mêmes enzymes voient leur expression varier de manière identique lors de la surexpression d'un dominant positif de SREBP-1c dans des myotubes (Guillet-Deniau *et al.* 2002). Ainsi, SREBP-1c est impliqué dans la régulation positive comme dans la régulation négative des gènes du métabolisme des lipides et des carbohydrates en réponse à l'alimentation.

De nombreux gènes, dont l'expression évolue en réponse aux variations nutritionnelles, possèdent au niveau de leur promoteur un site SRE (Ducluzeau *et al.* 2001; Tsintzas *et al.* 2006). Des expériences d'immunoprécipitation de chromatine ont montré que SREBP-1c se liait au promoteur de *FAS*, codant pour une enzyme clé de la lipogenèse, et *HKII*, codant pour une enzyme impliqué dans le métabolisme glucidique (Gosmain *et al.* 2004). Dans le muscle, la liaison de SREBP-1c sur ces promoteurs est modulée en fonction de l'état nutritionnel ; très faible au cours du jeûne, l'association de SREBP-1c et des promoteurs de *FAS* et *HKII* est nettement augmentée au cours de la réalimentation des rats (Figure 43) (Gosmain *et al.* 2005). SREBP-1c peut donc réguler directement les gènes impliqués dans le métabolisme des lipides et des carbohydrates en fonction du statut nutritionnel.

### **b) Régulation transcriptionnelle par LXR/RXR**

Deux facteurs de transcription ont été clonés et décrits comme de puissants activateurs du promoteur murin de SREBP-1c. Il s'agit des récepteurs aux oxystérols LXR, Liver X receptor (Yoshikawa *et al.* 2001). L'expression de SREBP-1c est abolie chez les souris KO pour LXR  $\alpha$  et LXR $\beta$ , indiquant que ce facteur est le régulateur transcriptionnel principal de SREBP-1 (Repa *et al.* 2000). L'analyse des promoteurs murin et humain de *SREBF1* révèle la présence de LXRE, sites de fixation des LXR, semblable à ceux mis en évidence sur le promoteur de ABCA1, un gène cible connu des LXRs (Repa *et al.* 2000; Dif *et al.* 2006). L'administration d'un agoniste LXR chez le rongeur, ainsi que le traitement *in vitro* de cellules hépatiques, induisent l'expression de SREBP-1 et de ses gènes cibles *FAS*, *ACC1* et

*SCD1* (Schultz *et al.* 2000; Nakatani *et al.* 2005). Cette induction est abolie par la mutation des sites LXRE sur le promoteur de *SREBF1*, indiquant que SREBP-1c est régulé par liaison directe de LXR sur son promoteur. En effet, le traitement par un agoniste de LXR permet sa fixation sur le promoteur régulant l'expression de SREBP-1c. Au cours du jeûne, la liaison de LXR sur ce promoteur est fortement diminuée, indiquant que LXR pourrait participer à la régulation de SREBP-1c par l'état nutritionnel (Nakatani *et al.* 2005).

Dans le muscle squelettique de souris, LXR  $\alpha$  et LXR $\beta$  sont exprimés à des niveaux identiques. L'administration d'agoniste LXR chez des souris, induit une augmentation de presque 10 fois du taux d'expression de SREBP-1c dans le quadriceps. L'expression des gènes de *FAS* et *SCD-1*, gènes cibles de SREBP-1c, est également induite par traitement avec un agoniste LXR de cellules musculaires murines C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> (Muscat *et al.* 2002).

Les facteurs LXR se lient à l'ADN des promoteurs de leurs gènes cibles sous forme d'hétéro-dimères avec les récepteurs à l'acide rétinoïque RXR, retinoic X receptor. Ainsi la co-expression de RXR et LXR active de façon synergique le promoteur de SREBP-1c (Yoshikawa *et al.* 2001). L'administration orale d'agoniste RXR induit l'expression de SREBP-1c dans le foie, l'intestin et le tissu adipeux blanc chez la souris (Repa *et al.* 2000). La quantité de forme nucléaire de SREBP-1c est également augmentée de façon parallèle à la quantité d'ARNm. L'agoniste RXR n'induit par contre aucune modification d'expression de SREBP-1a.

Trois isoformes de RXR,  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , existent. Dans le muscle squelettique, RXR $\gamma$  est préférentiellement exprimé et parmi les trois isoformes, seul RXR $\gamma$  est régulé en fonction du statut nutritionnel. Comme SREBP-1c dans le muscle de rat, son expression s'effondre lors du jeûne et est fortement stimulée au cours de la réalimentation. Alors qu'RXR $\alpha$  et RXR $\beta$  sont fortement exprimés au cours du jeûne. L'expression des LXR $\alpha$  et  $\beta$  ne varie pas au cours des changements nutritionnels (Kamei *et al.* 2008).

Parmi toutes les isoformes de LXR et RXR, seule l'expression de RXR $\gamma$  est corrélée positivement à l'expression de SREBP-1c dans le muscle au cours des changements de statut nutritionnel. *In vitro*, RXR $\alpha$  et RXR $\gamma$  sous forme d'hétéro-dimères avec LXR $\alpha$  activent le promoteur régulant l'expression de SREBP-1c et induisent une augmentation du niveau d'ARNm correspondant. Des souris transgéniques déficientes en RXR $\gamma$  ou au contraire le surexprimant, présentent respectivement une diminution et une augmentation de l'expression



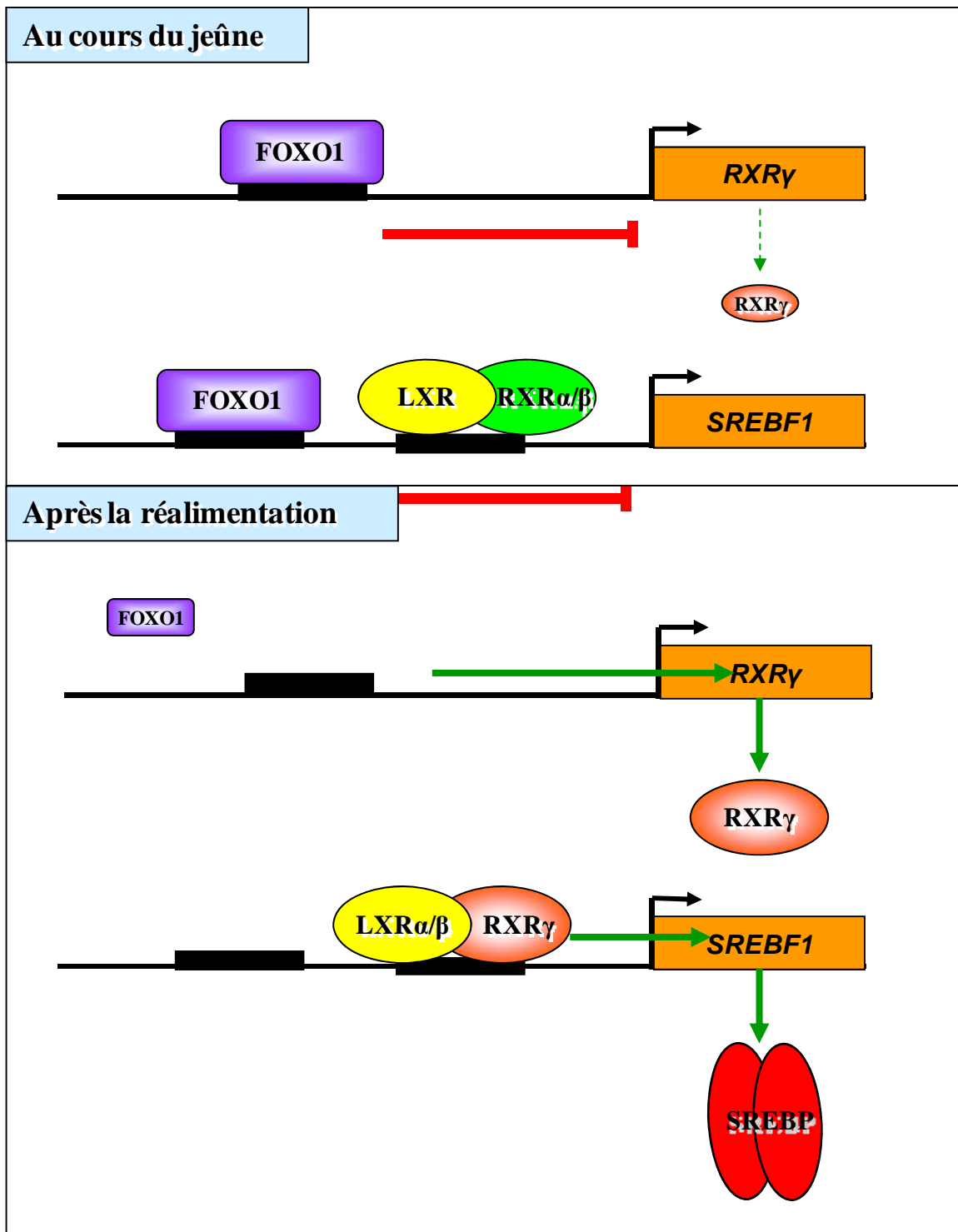
de SREBP-1c dans leur muscle squelettique. Ces données indiquent que RXR $\gamma$ , sous forme d'hétérodimère avec LXR, peut réguler l'expression de SREBP-1c dans le muscle squelettique en fonction du statut nutritionnel.

L'expression d'un autre facteur de transcription est corrélée à l'expression de SREBP-1c au cours du jeûne, mais de façon négative. Il s'agit de FOXO1, Forkhead-O1 transcription factor. A l'inverse de SREBP-1c et RXR $\gamma$ , l'expression de FOXO-1 est fortement induite par le jeûne et diminue au cours de la réalimentation. *In vitro*, FOXO-1 inhibe l'activation transcriptionnelle de SREBP-1c induite par RXR/LXR. L'expression de SREBP-1c est fortement diminuée dans le muscle de souris transgénique surexprimant FOXO-1. L'expression de RXR $\gamma$  est également diminuée chez ces souris.

Basé sur ces observations, un modèle de régulation de l'expression de SREBP-1c dans le muscle squelettique au cours des changements d'état nutritionnel est proposé par Kamei et al (2008) (Figure 44).

Au cours du jeûne, FOXO-1 est fortement exprimé, et inhibe l'expression de RXR $\gamma$ , qui ne peut activer l'expression de SREBP-1c. L'expression de RXR $\alpha$ /RXR $\beta$  n'étant pas diminuée par le jeûne, ils pourraient remplacer RXR $\gamma$  sur le promoteur régulant l'expression de SREBP-1c. Mais FOXO-1, en agissant directement comme corépresseur ou en recrutant d'autres co-répresseurs au promoteur de *SREBF1*, inhibe la transactivation transmise par RXR/LXR. Au cours du jeûne, FOXO-1 supprime donc l'expression de SREBP-1c par deux mécanismes, d'une part en inhibant l'expression de RXR $\gamma$  et d'autre part en empêchant la transactivation par RXR $\gamma$ /LXR ou RXR $\alpha$ / $\beta$ /LXR.

Au cours de la réalimentation, l'expression de FOXO-1 chute, l'expression de RXR $\gamma$  augmente. RXR $\gamma$  sous forme d'hétérodimère avec LXR $\alpha$ / $\beta$  se fixe sur le promoteur de *SREBF1*, active sa transcription et ainsi l'expression de SREBP-1c.



**Figure 44:** Mécanisme de régulation de l'expression de SREBP-1 en réponse aux variations nutritionnelles

d'après Kamei *et al.* 2008

### c) Régulation nutriment-spécifique

En plus du statut nutritionnel, l'expression de SREBP-1c semble pouvoir être régulé par la composition même du régime alimentaire. Ainsi, alors qu'un régime riche en carbohydrates renforce l'effet de la réalimentation sur l'expression de SREBP-1c dans le muscle squelettique, un régime riche en gras atténue cet effet (Bizeau *et al.* 2003).

#### ➤ Régulation par les acides gras

Ainsi, l'expression de SREBP-1c peut-être modulée par l'apport lipidique au sein du muscle squelettique. Les acides gras polyinsaturés, AGPI, ont été largement décrits pour inhiber l'expression de SREBP-1c (Edwards *et al.* 2000; Osborne 2000; Horton *et al.* 2002a; McPherson and Gauthier 2004). *In vitro*, l'addition d'acide oléique ou d'autres acides gras insaturés à longue chaîne dans le milieu de culture, inhibe la transcription des gènes *SREBF1* et *SREBF2* ainsi que la maturation de SREBP-1 et 2 (Thewke *et al.* 1998; Worgall *et al.* 1998). Plusieurs études *in vivo* montrent que l'ajout d'AGPI dans le régime de rongeurs inhibe l'expression de SREBP-1c et la lipogenèse dans le foie. Dans ces études, SREBP-2 n'est pas affecté par les AGPI (Kim *et al.* 1999a; Mater *et al.* 1999; Yahagi *et al.* 1999; Xu *et al.* 2002).

Les AGPI semblent inhiber l'expression des SREBP-1 et -2 à plusieurs niveaux. D'une part, en bloquant le clivage du précurseur. La quantité de SREBP mature présente dans le noyau diminue et avec elle, l'activation transcriptionnelle des gènes de la lipogenèse (Yahagi *et al.* 1999; Hannah *et al.* 2001; Xu *et al.* 2002). Le mécanisme par lequel les AGPI inhibent la maturation de SREBP n'est pas encore élucidé. Toutefois, les AGPI stimulent l'expression d'Insig-1, protéine de rétention de SREBP dans le RE (Botolin *et al.* 2006). D'autre part les AGPI semblent accélérer la dégradation de l'ARNm codant pour SREBP-1 (Hannah *et al.* 2001; Xu *et al.* 2002; Nakamura *et al.* 2004). Enfin, les AGPI inhibent l'activation de l'expression de SREBP-1c par LXR. En effet, les AGPI jouent le rôle d'antagoniste sur LXR, en bloquant son activation par compétition avec son ligand naturel, les oxystérols (Ou *et al.* 2001). L'inhibition de SREBP par les AGPI contribue à leurs effets hypo-triglycéridémiant, à présent bien reconnus.

## ➤ Régulation par le glucose

L'expression de SREBP-1c peut-être aussi modulée par la composition en carbohydrates du régime alimentaire. Ainsi, des rats renourris avec un régime enrichi en carbohydrates, composé exclusivement d'amidon de maïs, présentent une activation de l'expression de SREBP-1c dans le foie et le muscle squelettique plus marquée que des rats renourris avec un régime riche en gras (Bizeau *et al.* 2003).

De nombreuses expériences chez le rongeur montrent qu'un régime enrichi en carbohydrates (85% d'apport énergétique sous forme de carbohydrates, moins de 1% sous forme d'acides gras) induit fortement l'expression des enzymes de la lipogenèse (Granner and Pilkis 1990; Towle 1995; Towle *et al.* 1997). Dans le foie, le tissu adipeux et les cellules  $\beta$  pancréatiques, le glucose peut stimuler l'expression de la FAS, ACC, SCD-1 et L-PK, liver type pyruvate kinase (Girard *et al.* 1997; Fougelle *et al.* 1998; Andreolas *et al.* 2002). Ces enzymes sont toutes régulées au niveau transcriptionnel par SREBP-1.

Des expériences *in vitro* montrent que le glucose régule directement l'expression de SREBP-1. Ainsi, le glucose stimule l'expression du précurseur et de la forme mature de SREBP-1 de manière dose-dépendante dans des cellules hépatiques (Hasty *et al.* 2000). SREBP-1 est régulé par le glucose au niveau transcriptionnel. En effet, le glucose stimule l'activité du promoteur murin de *srebfl* et augmente le niveau d'ARNm cellulaire. En revanche, le clivage du précurseur SREBP-1 n'est pas affecté par le traitement au glucose. Si le glucose stimule l'expression à la fois de SREBP-1c et de SREBP-1a, SREBP-1c est plus fortement activé. SREBP-1c est donc l'isoforme la plus sensible à la régulation par le glucose. L'induction de l'expression de SREBP-1 par le glucose est observé dans d'autres types cellulaires, notamment les cellules  $\beta$  pancréatiques et les cellules rénales (Andreolas *et al.* 2002; Sun *et al.* 2002; Sandberg *et al.* 2005).

Le mécanisme par lequel l'expression de SREBP-1c est activée par le glucose n'est pas connu. Cependant, nous avons vu que LXR est le principal facteur régulant directement l'activité transcriptionnelle de SREBP-1c. Une étude récente montre que LXR pourrait être activé directement par le glucose, celui-ci se comportant comme un ligand naturel de ce facteur (Mitro *et al.* 2007). LXR ainsi activé pourrait transmettre les effets du glucose sur l'expression de SREBP-1c.

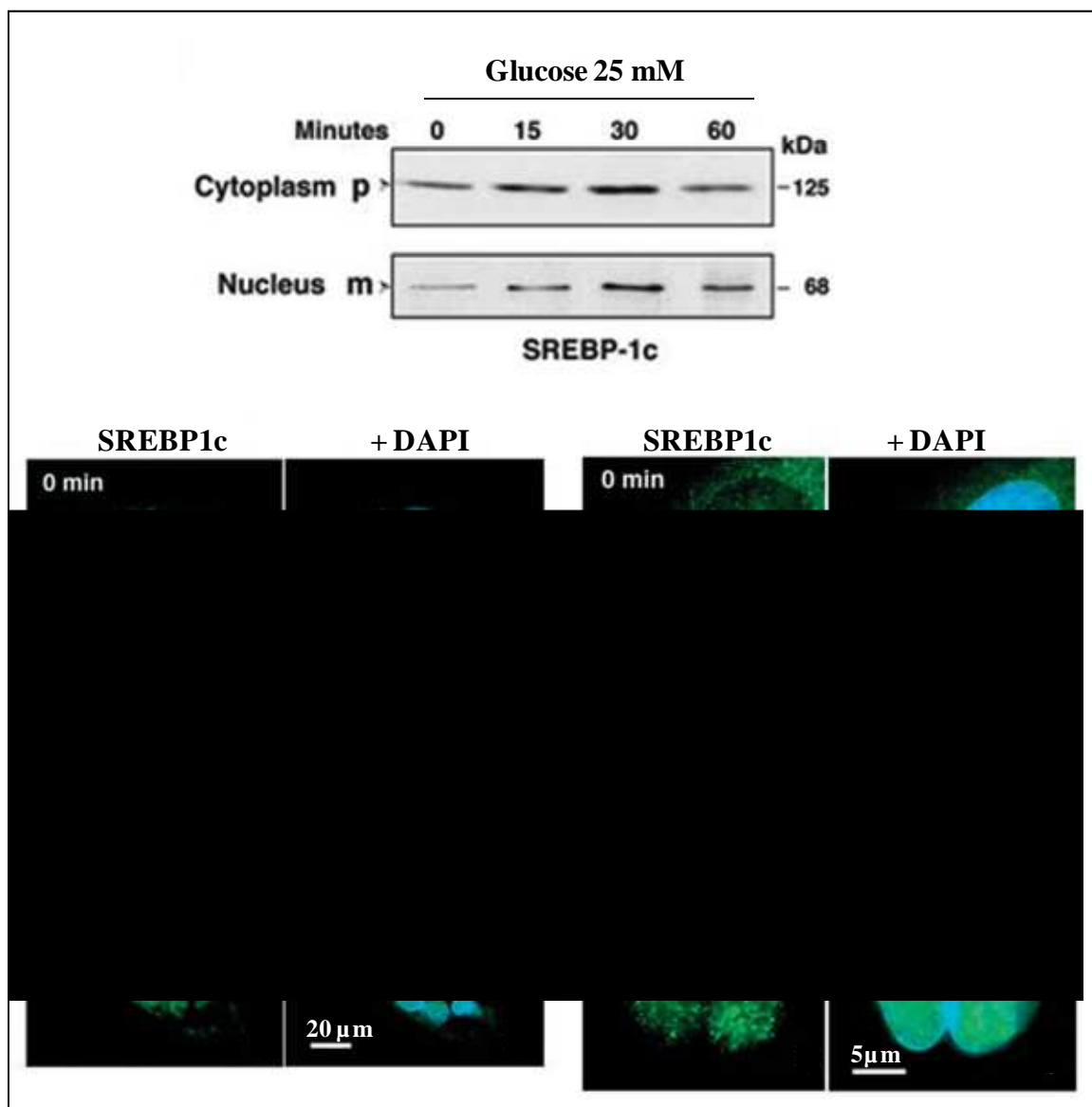
Dans chaque modèle, l'activation de SREBP-1 est accompagnée par une induction des enzymes lipogéniques FAS et ACC. L'activation de SREBP-1c pourrait donc être le mécanisme par lequel les carbohydrates induisent l'expression des enzymes de la lipogenèse *in vivo*. Ce mécanisme se vérifie *in vivo*, l'apport d'un régime riche en carbohydrates induisant effectivement une augmentation de l'expression de SREBP-1c et des enzymes lipogéniques dans le foie et le tissu adipeux chez les rongeur (Horton *et al.* 1998; Shimano *et al.* 1999; Miyazaki *et al.* 2004; Letexier *et al.* 2005) ainsi que chez l'homme (Minehira *et al.* 2004).

Ce mécanisme est pourtant controversé, des données contradictoires existant dans la littérature. Ainsi, deux études différentes réalisées sur des hépatocytes ne montrent aucune variation de l'expression de SREBP-1c en réponse à une incubation dans un milieu riche en glucose, alors que l'expression de la FAS est bien stimulée (Foretz *et al.* 1999b; Deng *et al.* 2002). De plus, Deng *et al.* montrent que le promoteur de rat de SREBP-1c ne répond pas à la stimulation par le glucose. Une troisième étude soumet des hommes sains soit à une ingestion orale de glucose, soit à un régime riche en carbohydrates pendant 2 semaines. Le niveau de SREBP-1c dans le foie ou le tissu adipeux des sujets reste constant dans les deux situations, ainsi que l'expression de la FAS et ACC1.

Alors que les enzymes glycolytiques et lipogéniques sont également exprimées dans le muscle squelettique, leur régulation par le glucose au sein de cet organe est peu étudiée. Une étude évalue les effets d'une hyperglycémie chronique sur le métabolisme lipidique des cellules musculaires humaines et montre l'apport excessif de glucose conduit à une accumulation de triglycérides dans les cellules musculaires, alors que l'oxydation des acides gras n'est pas altérée. L'augmentation des lipides intramyocytaires résulte donc d'une lipogenèse de novo (Aas *et al.* 2004). D'autre part, Guillet-Deniau *et al.* (Guillet-Deniau *et al.* 2004) testent l'effet d'un milieu riche en glucose sur des myotubes différenciés issus de cellules musculaires de rat. Cette étude démontre que le glucose seul stimule l'expression des enzymes HKII, FAS et ACC2 et induit l'accumulation de lipides intramyocytaires, après 24h de traitement. Dans ces myotubes, l'expression de SREBP-1c est fortement augmentée dès 30 minutes de traitement. Contrairement à ce qui est observé dans les cellules hépatiques, le glucose ne stimule pas la transcription de *SREBF1*, le niveau en ARNm restant constant. Par contre, le glucose stimule le clivage de SREBP-1c et sa translocation dans le noyau cellulaire (Figure 45). L'activation du clivage de SREBP-1c par le glucose semble être transmise par la

voie de signalisation JAK-STAT, la maturation de SREBP-1c en réponse au glucose nécessitant la phosphorylation de STAT3.

Dans le muscle squelettique, le glucose stimule donc rapidement l'expression de SREBP-1c qui, en activant ses gènes cibles codant pour les enzymes de la lipogenèse, induit une lipogenèse de novo, conduisant à l'accumulation de lipides intramyocytaires. De cette façon, SREBP-1c participe au phénomène de lipotoxicité musculaire induit par l'hyperglycémie (Dulloo *et al.* 2004).



**Figure 45:** Régulation de l'expression de SREBP-1c par le glucose

d'après Guillet-Deniau *et al.* 2004

### 3.2.2. SREBP-1 : médiateur des effets de l'insuline dans le muscle squelettique

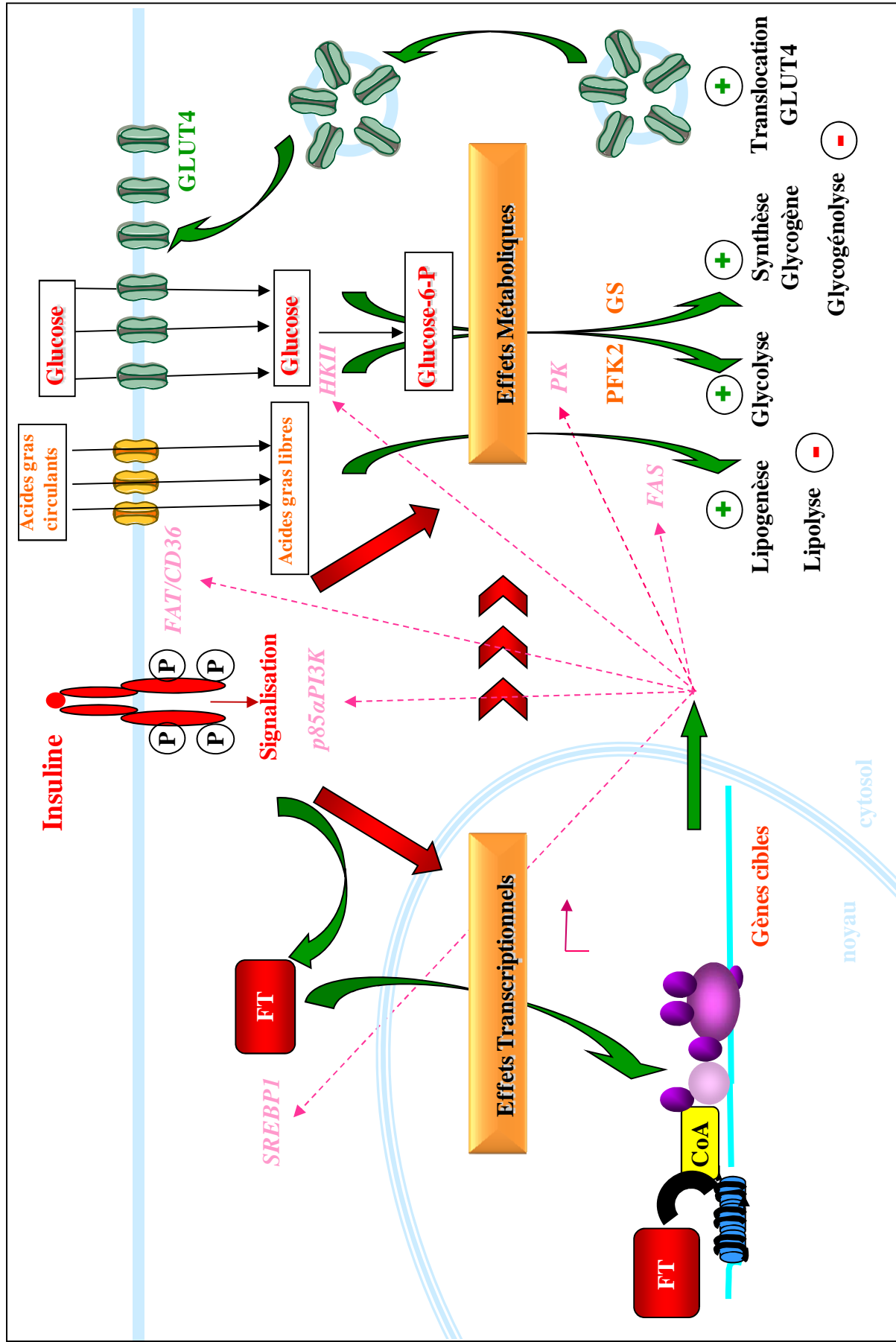
#### a) Action de l'insuline

L'insuline est une hormone polypeptidique sécrétée par les cellules  $\beta$  des îlots de Langerhans pancréatique. La sécrétion d'insuline intervient principalement en phase post-prandiale afin de maintenir une glycémie normale. L'insuline exerce une action hypoglycémisante en favorisant le stockage et l'utilisation du glucose d'une part et en inhibant sa synthèse et sa libération d'autre part. Les trois principaux organes insulino-sensibles sont le foie, le tissu adipeux et le muscle. L'insuline stimule la glycogénogenèse et la lipogenèse dans le foie, le tissu adipeux et le muscle, afin de stocker dans ces organes le glucose sous forme de glycogène et de triglycérides. Elle active également la glycolyse, afin de favoriser l'utilisation de ce glucose. Dans le muscle squelettique, l'insuline augmente l'entrée de glucose dans les cellules musculaires en stimulant la translocation à la membrane du récepteur au glucose GLUT-4. L'insuline bloque la libération de glucose et d'acides gras dans le sang en inhibant la glycogénolyse dans le foie et le muscle, la néoglucogenèse dans le foie et rein et la lipolyse dans le tissu adipeux (Figure 46).

L'insuline a par ailleurs des effets importants sur le métabolisme des protéines, elle inhibe la dégradation des protéines et favorise la captation des acides aminés au niveau hépatique et musculaire. Au delà de son effet immédiat sur la régulation des flux de substrats, l'insuline a des effets à plus long terme sur la croissance : c'est une hormone anabolisante.

L'action de l'insuline est initiée par sa liaison à son récepteur membranaire à activité tyrosine kinase qui subit alors une autophosphorylation. L'insuline active ainsi deux grandes voies de signalisation : la voie PI3-kinase/AKT, responsable principalement de ses effets métaboliques et la voie des MAPKinases, responsable principalement de ces effets anaboliques (Okada *et al.* 1994; Kim and Kahn 1997).

Grâce à l'activation de ces voies de signalisation, l'insuline peut réguler le métabolisme glucidique et lipidique directement par le biais de modifications post-traductionnelles sur les enzymes impliquées, par exemple par phosphorylation de la Phospho-fructo-kinase 2, enzyme de la glycolyse, ou de la Glycogène synthase (Figure 46).



**Figure 46 :** Action de l'insuline sur le muscle squelettique



En plus de ce niveau de régulation directe, l'insuline agit sur l'expression de nombreux gènes. Il a notamment été montré au laboratoire que, dans le muscle squelettique humain, une situation d'hyperglycémie est associée à la modification de l'expression de plus de 800 gènes (Rome *et al.* 2003). Cette action transcriptionnelle de l'insuline implique l'interaction de facteurs de transcription avec des éléments de réponse au niveau des régions régulatrices des gènes cibles de l'insuline (Figure 46).

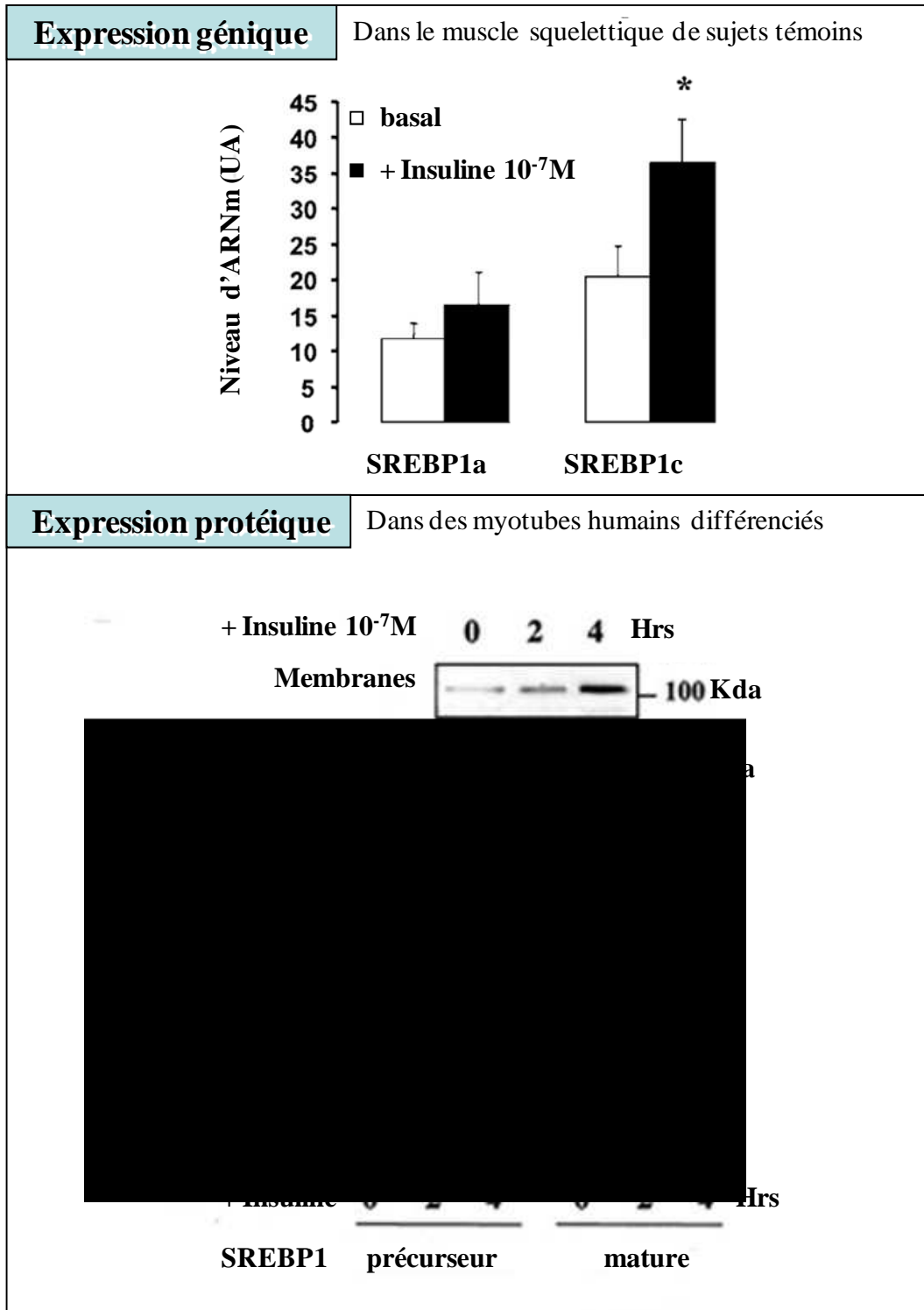
#### **b) SREBP-1c : médiateurs des effets géniques de l'insuline**

SREBP-1c est exprimé dans les trois organes insulino-sensibles et son expression dans le muscle squelettique est régulée par les changements d'état nutritionnel, de façon parallèle à la sécrétion d'insuline, augmentant en phase post-prandiale et diminuant au cours du jeûne. De plus, SREBP-1c est fortement induit par un régime riche en carbohydrates stimulant la sécrétion d'insuline. SREBP-1c est donc un bon candidat comme médiateur des effets transcriptionnels de l'insuline.

Une des premières études suggérant un rôle majeur de SREBP-1c dans l'action de l'insuline montre que la surexpression de SREBP-1c dans des adipocytes mime l'effet de l'insuline sur les promoteurs des gènes de la FAS et de la leptine (Kim *et al.* 1998a). Le traitement par l'insuline d'adipocytes et d'hépatocytes en culture augmente l'expression génique de SREBP-1c, ainsi que l'expression protéique des formes précurseurs et nucléaires de SREBP-1c (Kim *et al.* 1998b; Foretz *et al.* 1999a; Azzout-Marniche *et al.* 2000). L'utilisation d'un dominant négatif de SREBP-1 s'oppose à l'induction des gènes codant des enzymes telles que la FAS, la Glucokinase et ACC par l'insuline. Par contre, un dominant positif de SREBP-1c est capable d'induire l'expression de la GK et des gènes de la lipogenèse en absence d'insuline (Foretz *et al.* 1999a; Foretz *et al.* 1999b).

Dans le muscle squelettique également, l'expression de SREBP-1c est activée par l'insuline. En effet, des myotubes en culture, issus de cellules musculaires humaines ou de rat, traités par l'insuline présentent une augmentation de l'expression de l'ARNm de SREBP-1c. L'effet de l'insuline sur l'expression de SREBP-1c est dose-dépendant (Nadeau *et al.* 2004). Une augmentation similaire de l'expression protéique est observée, aussi bien au niveau de la fraction membranaire, contenant le précurseur, qu'au niveau de la fraction nucléaire, contenant la forme mature (Figure 47) (Guillet-Deniau *et al.* 2002; Gosmain *et al.* 2004). Chez l'homme, l'insuline induit également l'expression de SREBP-1c dans le muscle

squelettique de sujets sains soumis à un clamp hyperinsulinémique-euglycémique de trois heures (Ducluzeau *et al.* 2001; Sewter *et al.* 2002). L'expression de SREBP-1a est insensible au traitement par l'insuline (Figure 47) (Shimomura *et al.* 1999; Gosmain *et al.* 2004; Dif *et al.* 2006).



**Figure 47** : Régulation de l'expression de SREBP-1 par l'insuline  
d'après Dif *et al.* 2006 ; Guillet-Deniau *et al.* 2002

L'insuline exerce donc une régulation transcriptionnelle sur l'expression de SREBP-1c. L'étude des promoteurs de rats et souris régulant l'expression de SREBP-1c montre que l'induction de leur activité promotrice par l'insuline, nécessite la présence sur le promoteur de sites de liaison à NFY, Sp1, LXR et SREBP-1c lui-même (Deng *et al.* 2002; Cagen *et al.* 2005). La mutation des sites LXRE sur le promoteur de rat, ainsi que l'inhibition de l'activation de LXR par l'acide arachidonique, bloque l'action de l'insuline sur SREBP-1c (Chen *et al.* 2004). Comme pour la régulation de SREBP-1c par le statut nutritionnel, LXR semble donc essentiel à la régulation de SREBP-1c par l'insuline. L'utilisation d'un SiRNA contre Sp1 réduit la réponse de SREBP-1c à l'insuline. L'insuline en fait favorise l'interaction entre Sp1, LXR $\alpha$  et SREBP-1c lui-même, et facilite le recrutement de ces trois protéines au promoteur de SREBP-1c. Sp1 accélère donc l'action de l'insuline en aidant au recrutement de SREBP-1c et LXR sur le promoteur de SREBP-1c (Deng *et al.* 2007). SREBP-1c semble donc activer son propre promoteur en réponse à l'insuline. L'étude du promoteur humain de SREBP-1c révèle que la présence de SRE dans la région proximale du promoteur est indispensable à l'induction transcriptionnelle de SREBP-1c par l'insuline. De plus, l'insuline augmente la liaison de SREBP-1 sur cette région promotrice. Enfin, la surexpression de SREBP-1c et de SREBP-1a stimule l'expression de SREBP-1c. Le principal activateur de l'expression de SREBP-1c en réponse à l'insuline est donc SREBP-1 lui-même, initiant ainsi une boucle d'amplification des effets de l'insuline sur le muscle squelettique.

Cependant, l'activation transcriptionnelle de SREBP-1c par l'insuline apparaît faible par rapport à la très forte induction des gènes tels que la FAS. En fait, d'autres mécanismes d'activation de SREBP-1c par l'insuline sont mis en jeu.

Premièrement, l'insuline semble réguler la maturation de SREBP-1c, en modifiant l'expression des protéines Insig. L'inhibition de Insig-2 pourrait contribuer à l'activation de la maturation de SREBP par l'insuline. En effet, l'insuline diminue l'expression de Insig-2 dans le foie de souris et les hépatocytes de rats, alors qu'elle tend à augmenter l'expression de Insig-1 (Yabe *et al.* 2002; Yabe *et al.* 2003; Engelking *et al.* 2004). En diminuant la quantité de Insig-2, l'insuline favoriserait le passage des complexes SCAP-SREBP dans l'appareil de Golgi et ainsi la libération de SREBP mature.

Deuxièmement, l'insuline peut stimuler l'activité transcriptionnelle de SREBP-1c grâce à des modifications post-traductionnelle de type phosphorylation.

Yellaturu *et al.* (2009), montrent que l'insuline induit, via l'activation de la voie PI3K-AKT, la phosphorylation du précurseur de SREBP ancré à la membrane du RE. Le complexe

mTORC1, activé par AKT pourrait être responsable de cette phosphorylation, de part sa co-localisation avec SREBP-1 dans le RE et l'appareil de Golgi. Cette phosphorylation active la maturation de SREBP en favorisant son passage du RE à l'appareil de Golgi (Yellaturu *et al.* 2009). D'autre part, AKT inhibe l'activité de la glycogène synthase kinase GSK3 $\beta$ . La GSK3 $\beta$  induit la dégradation de SREBP-1 par le système ubiquitine-protéasome, en phosphorylant deux résidus sérines thréonines. Ainsi, l'activation d'AKT par l'insuline provoque une accumulation de SREBP mature dans le noyau, d'une part en stimulant sa maturation dans le RE, d'autre part, en inhibant sa dégradation dans le noyau.

Kotzka *et al.* (Kotzka *et al.* 2000; Roth *et al.* 2000; Kotzka *et al.* 2004; Kotzka and Muller-Wieland 2004) démontrent que SREBP peut être également phosphorylé par les MAPKinases ERK-1/2, aussi activées par l'insuline (Kim and Kahn 1997).

Nadeau *et al.* montrent que, SREBP-1 peut être activé par l'insuline dans le muscle squelettique par la voie des MAPKinases. Dans cette étude, le traitement de cellules musculaire de rats L6 par la Wortmannin ou le LY294002, inhibiteurs de la voie PI3Kinase, n'a pas d'effet significatif sur l'activation de SREBP-1 par l'insuline, ni au niveau de l'expression génique, ni au niveau de l'expression protéique membranaire et nucléaire. Par contre, lorsque ces mêmes cellules sont traitées par un inhibiteur de la voie des MAPKinases, PD98059, l'insuline échoue à augmenter la quantité d'ARNm codant pour SREBP-1c, ainsi que la quantité de précurseurs membranaires et la quantité de protéines matures. L'activation de l'expression de SREBP-1 par l'insuline dans les myocytes répond donc toujours à l'insuline en présence d'inhibiteur de la voie PI3Kinase mais est complètement bloquée en présence d'inhibiteur de la voie des MAPKinases (Nadeau *et al.* 2004). L'effet de l'insuline sur SREBP-1c dans le muscle squelettique est donc dépendant de l'activation des MAPKinases.

Dans les cellules musculaires en culture, la surexpression de SREBP-1c conduit à une élévation de l'expression de la FAS, de l'ATP-citrate liase et de HKII, l'Hexokinase II, similaire à celle induite par l'insuline (Guillet-Deniau *et al.* 2002). De la même façon que dans des hépatocytes, l'expression d'un dominant négatif de SREBP-1c, s'opposant à l'activité de SREBP-1c endogène, bloque l'induction par l'insuline des gènes *HKII* et *FAS*. De plus, le traitement par l'insuline de myotubes humains en culture primaire augmente la liaison de SREBP-1c sur le promoteur de *HKII* (Gosmain *et al.* 2004). La surexpression de

SREBP-1c mime également les effets de l'insuline sur l'expression de UCP3, Uncoupling protein 3, mais cette fois en inhibant son expression.

Dans le muscle squelettique, comme dans le foie et le tissu adipeux, SREBP-1c transmet donc les effets de l'insuline, positifs comme négatifs, sur ses gènes cibles. L'implication de SREBP-1c dans la régulation glycolytique, lipogénique, ainsi que la régulation du gène UCP3 suggère un rôle critique de SREBP-1c dans la régulation des substrats énergétiques par l'insuline. Ainsi, SREBP-1c participe à la sensibilité à l'insuline du muscle squelettique et une dérégulation de son expression pourrait favoriser le développement de pathologies métaboliques liées à l'insulino-résistance, le diabète et l'obésité.

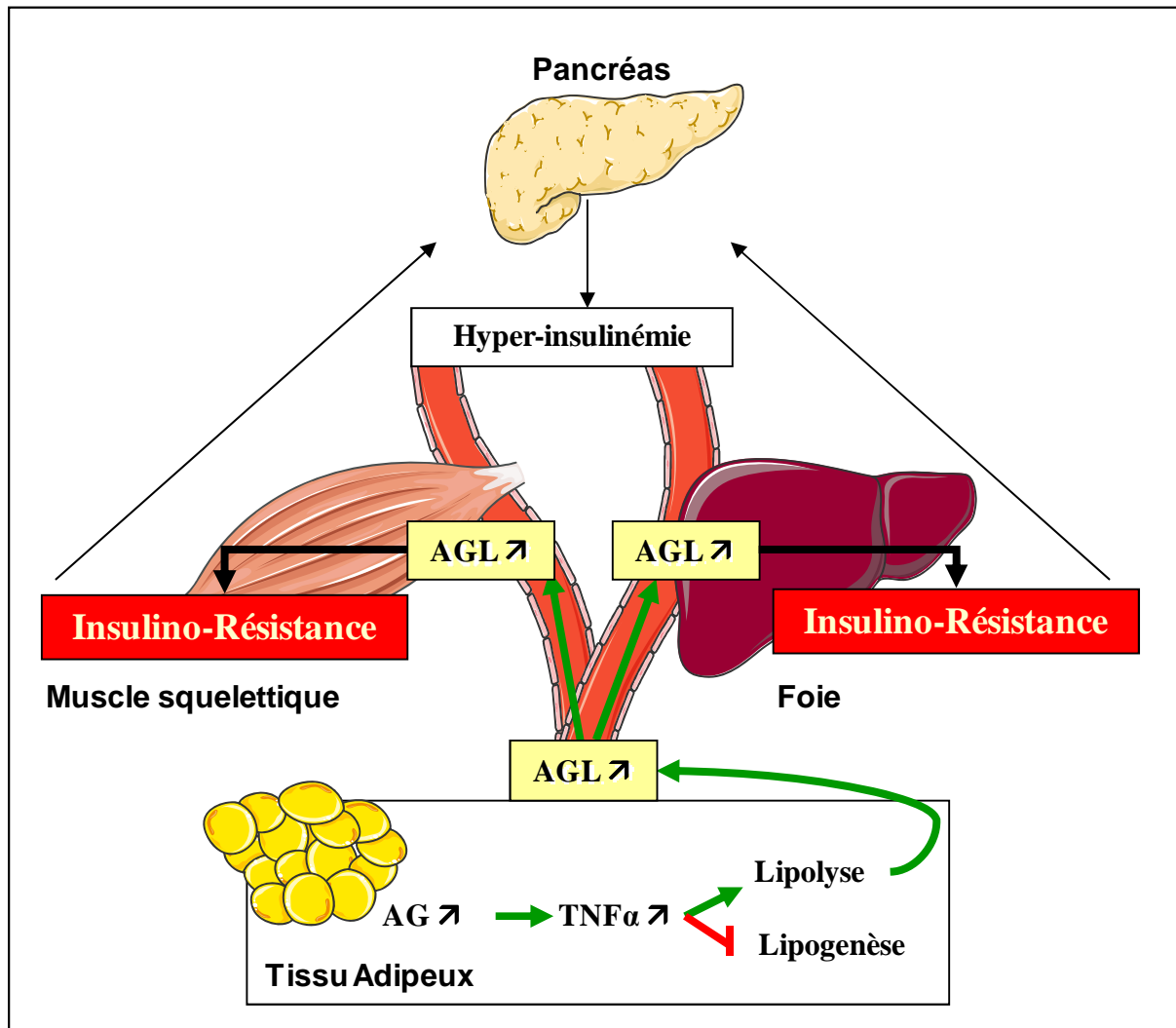
### **c) Implications de SREBP-1c dans l'insulino-résistance musculaire**

#### **➤ Définition et mécanismes de l'insulino-résistance**

Le terme insulino-résistance désigne une perte de sensibilité des cellules à l'action de l'insuline. Elle se traduit donc par une moindre efficacité de l'insuline sur ces tissus cibles. L'insulino-résistance est fortement associée au développement du syndrome métabolique. Le syndrome métabolique, ou syndrome X, est l'association de plusieurs anomalies métaboliques comprenant l'obésité abdominale, l'hypertriglycéridémie, l'hyperglycémie, l'hyperinsulinémie et l'hypertension. Il prédispose à la survenue d'un diabète de type 2.

L'obésité est un déterminant majeur de l'insulino-résistance, le risque de développement d'une insulino-résistance augmentant de façon parallèle à l'indice de masse corporelle, IMC. Une surcharge lipidique dans le tissu adipeux entraîne un état inflammatoire chronique de bas grade par la production de cytokines pro-inflammatoires, comme le Tumor Necrosis Factor  $\alpha$ , TNF  $\alpha$ , causant l'insulino-résistance des adipocytes (de Ferranti and Mozaffarian 2008). Le TNF  $\alpha$  réduit la synthèse et le stockage des triglycérides et accroît la lipolyse dans les adipocytes, entraînant une augmentation de la libération sanguine d'acides gras libres, AGL (Guilherme *et al.* 2008). Les AGL et les cytokines libérés en continu dans la circulation sanguine atteignent les muscles et le foie, où ils provoquent une insulino-résistance, par des mécanismes métaboliques et de stress (Figure 48). Lorsque l'insulino-résistance s'est développée dans tout l'organisme, les cellules des îlots  $\beta$  pancréatiques, pour contrecarrer ce processus, doivent sécréter d'importante quantité d'insuline, provoquant une

hyperinsulinémie. Au fil du temps les capacités sécrétoires des cellules  $\beta$  pancréatiques s'épuisent. L'apparition du diabète de type 2 qui s'en suit, résulte donc de l'association d'un déficit de sécrétion en insuline et d'un déficit d'action de l'insuline (Saltiel 2001; Saltiel and Kahn 2001).



**Figure 48:** Origine de l'insulino-résistance musculaire et hépatique

Les mécanismes par lesquels les AGL et les cytokines induisent l'insulino-résistance des myocytes et des hépatocytes sont divers, mais la plupart incluent l'inhibition à différents niveaux de la cascade de signalisation cellulaire activée par l'insuline.

L'augmentation des acides gras circulant causée par l'insulino-résistance des adipocytes, conduit à une accumulation lipidique intramyocytaire. Des études chez l'homme montrent une corrélation positive entre le taux des triglycérides intramyocytaires et l'insulino-

résistance musculaire (Mingrone *et al.* 2003; Schaffer 2003; Turcotte and Fisher 2008). Les acides gras intracellulaires semblent être à l'origine de l'insulino-résistance musculaire. Ils perturbent la cascade de signalisation de l'insuline dès ses étapes initiales, via l'activation de sérine/thréonine kinases, telles que les protéines kinases C. Les protéines Kinases C conduisant à la phosphorylation des IRS sur des résidus sérines (Figure 49) (Dresner *et al.* 1999; Griffin *et al.* 1999; Yu *et al.* 2002). Ceci bloque leur activation par l'insuline, l'activation de la PI3Kinase et l'activation du transport de glucose qui s'en suit. L'insulino-résistance musculaire est associée à une oxydation réduite ou incomplète des acides gras, provoquant une accumulation d'intermédiaires lipidiques dans les myocytes, tels que le diacylglycérol, les céramides et les acides gras-coenzyme A à longue chaîne. Ces intermédiaires lipidiques semblent être eux-mêmes à l'origine de l'insulino-résistance, le DAG réduisant l'activité de IRS-1 alors que les céramides entravent l'activité de la PKB (Itani *et al.* 2002; Chavez and Summers 2003; Ghosh *et al.* 2007; Koves *et al.* 2008). Il s'établit ainsi un cercle vicieux, les intermédiaires lipidiques induisant l'insulino-résistance musculaire et l'insulino-résistance conduisant à une accumulation de ces intermédiaires.

L'insulino-résistance musculaire est donc la résultante de plusieurs défauts des voies de signalisation responsables de son action. L'altération de la réponse cellulaire à l'insuline induit une dysrégulation de l'activité d'enzymes clés du métabolisme. Mais l'insuline agit également sur l'expression de nombreux gènes cibles, perturbée au cours de l'insulino-résistance. Ainsi, l'expression de l'hexokinase II, de la glycogène synthase ainsi que l'expression basale de la sous-unité régulatrice p85 $\alpha$  de la PI3Kinase, sont diminuées dans le muscle squelettique de patients DT2 (Vestergaard *et al.* 1993; Andreelli *et al.* 1999; Ducluzeau *et al.* 2001). D'autre part, l'induction de GLUT-4, HKII et p85 $\alpha$ PI3Kinase en réponse à l'insuline est altérée dans le muscle de patients DT2 (Ducluzeau *et al.* 2001). Cette anomalie dans l'expression des gènes en réponse à l'insuline suggère une altération dans l'expression et/ou l'activation des facteurs de transcription responsables des effets géniques de l'insuline, et notamment de SREBP-1c.

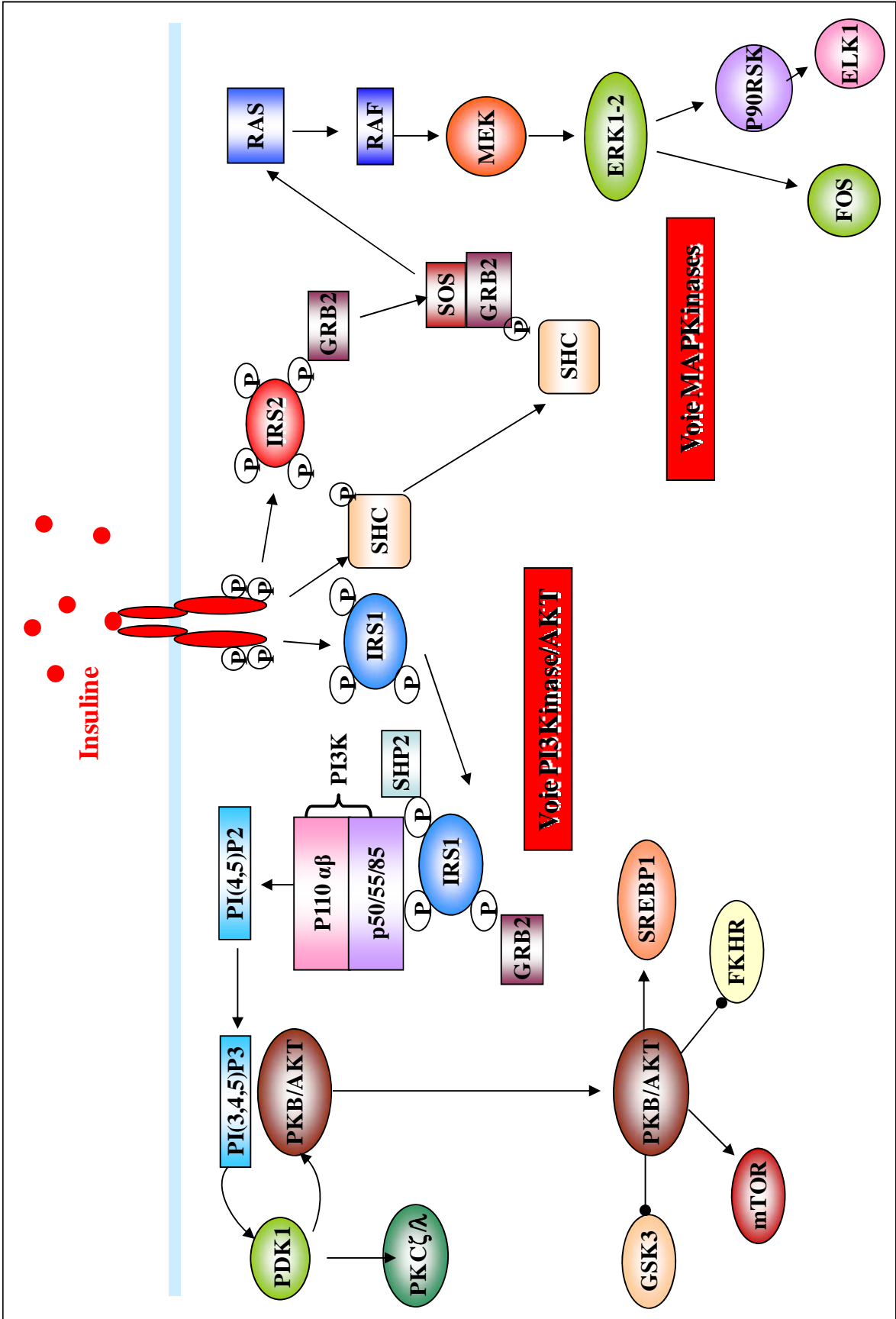


Figure 49 : Signalisation de l'insuline



### ➤ Implications de SREBP-1c dans l'insulino-résistance

Le rôle de SREBP-1c dans les maladies métaboliques peut être considéré sous deux angles opposés.

D'une part, en tant que facteur de transcription central dans l'action de l'insuline sur le métabolisme glucido-lipidique, une perte de fonction de SREBP-1c pourrait être impliquée dans la diminution de l'action de l'insuline sur ces gènes cibles, au cours de l'insulino-résistance (Ferre and Foufelle 2007). De façon concordante avec cette hypothèse, l'expression de SREBP-1c dans le tissu adipeux de sujets obèses et DT2, est plus faible que dans celui des sujets minces sains (Ducluzeau *et al.* 2001; Diraison *et al.* 2002; Sewter *et al.* 2002). De la même façon, des études transcriptomiques révèlent une diminution de l'expression de SREBP-1c dans le tissu adipeux de souris *ob/ob* et de souris obèses développant un diabète de type 2 (Nadler *et al.* 2000; Soukas *et al.* 2000). Cette diminution d'expression de SREBP-1c est considérée comme la conséquence de l'insulino-résistance. Ainsi, la perte de poids chez les patients obèses améliore l'insulino-sensibilité et entraîne une élévation de l'expression de SREBP-1c dans le tissu adipeux (Kolehmainen *et al.* 2001).

D'autre part, SREBP-1c induit la synthèse d'acides gras. L'accumulation lipidique intracellulaire étant à l'origine de mécanismes lipotoxiques impliqués dans le développement de l'insulino-résistance, SREBP-1c peut-être aussi considéré comme un facteur causal de l'insulino-résistance. Ainsi, les souris transgéniques surexprimant la forme nucléaire de SREBP-1 dans leur foie ou leur tissu adipeux développent un syndrome métabolique dont le tableau clinique se rapproche du syndrome métabolique humain (Shimomura *et al.* 1998; Takahashi *et al.* 2005). Les modèles animaux d'insulino-résistance, comme les souris *ob/ob* ou KO *IRS-2*, les rats Zucker *fa/fa*, souffrent de stéatose hépatique et présentent une élévation de SREBP-1c dans le foie (Shimomura *et al.* 1999). Malgré une insulino-résistance hépatique marquée au regard de la production de glucose, l'expression de SREBP-1c est toujours activée par l'insuline dans le foie de ces animaux. Ceci peut s'expliquer par le fait que l'activation de l'expression de SREBP-1c par l'insuline est dépendante de l'activation d'*IRS-1* dont l'expression n'est pas altérée dans le foie des animaux insulino-résistants, alors que l'expression d'*IRS-2*, régulant la production endogène de glucose, est inhibée.

L'insulino-résistance semble donc altérer l'expression de SREBP-1c de façon opposée selon les tissus, suivant leur sensibilité et leur réponse à l'insuline.

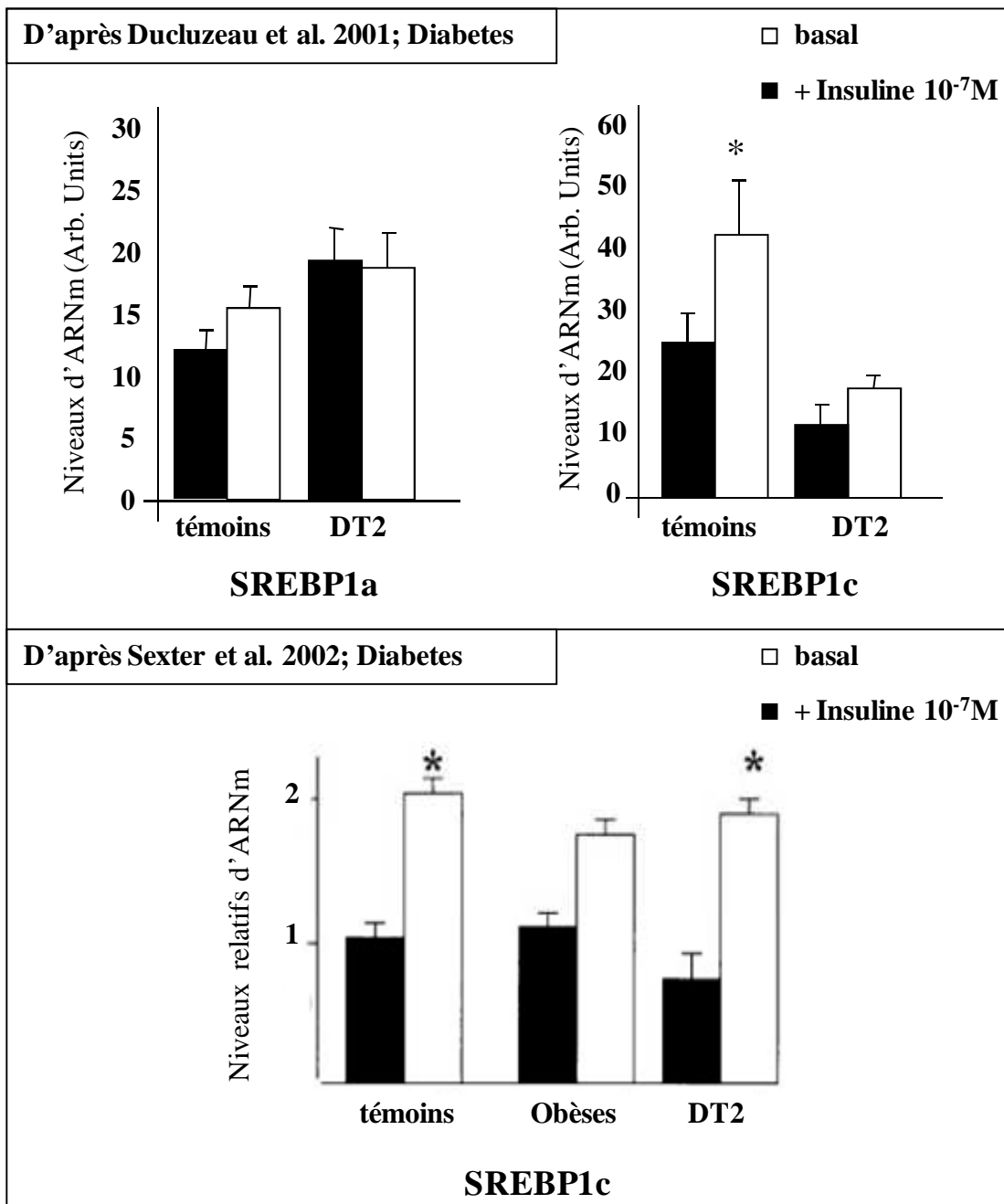
Dans le muscle squelettique aussi, l'expression de SREBP-1c est altérée par l'insulino-résistance (Figure 50). Cependant, les études réalisées chez l'homme divergent sur la nature de l'altération. Ducluzeau *et al.* (2001) montrent que l'expression basale de SREBP-1c dans le muscle des patients obèses et DT2 n'est pas différente de celle des sujets sains. Par contre, si l'expression de SREBP-1c est bien augmentée au cours d'un clamp hyperinsulinémique dans le muscle des sujets sains et obèses, l'insuline n'a aucun effet sur l'expression de SREBP-1c dans le muscle des patients DT2. Sewter *et al.* (2002) montrent à l'inverse que l'expression basale de SREBP-1c est plus faible dans le muscle squelettique de patients DT2 que dans le muscle de sujets sains et obèses. Par contre, un clamp hyperinsulinémique de trois heures induit une augmentation de l'expression musculaire de SREBP-1c chez ces patients DT2 (Sewter *et al.* 2002).

Dans le muscle squelettique, l'insulino-résistance résulte d'un défaut d'activation de la voie PI3Kinase. L'activité PI3Kinase diminue dans le muscle squelettique de patients DT2 (Kim *et al.* 1999b; Cusi *et al.* 2000), dans les myocytes en cultures primaires issues de ces patients DT2 (Bouzakri *et al.* 2003) ainsi que dans le muscle des souris ob/ob et des rats obèses fa/fa (Folli *et al.* 1993; Anai *et al.* 1998). Mais l'activité MAPKinase reste intacte dans le muscle squelettique des individus insulino-résistants (Krook *et al.* 2000). Ainsi, l'hyperinsulinémie qui s'établit pour compenser l'insulino-résistance périphérique, continue d'activer la voie MAPKinase musculaire. Comme décrit dans la section précédente, l'insuline stimule l'expression de SREBP-1c dans le muscle squelettique à la fois par la voie PI3Kinase et par la voie MAPKinase. L'activation de la voie MAPKinase par l'hyperinsulinémie compensatoire observée les patients obèses et DT2, pourrait donc conduire à une augmentation de l'expression de SREBP-1c (Nadeau *et al.* 2004; Nadeau *et al.* 2007). Cette stimulation de l'expression de SREBP-1c, associée au défaut d'oxydation des acides gras dans le muscle squelettique insulino-résistant, pourrait contribuer à l'accumulation de triglycérides intramyocytaires (TGIM) observée chez les patients obèses et DT2 (Bonen *et al.* 2004).

L'étude de Mingrone *et al.* supporte cette hypothèse. En effet, cette équipe met en évidence une corrélation forte entre l'insulino-résistance, le taux de TGIM et le niveau d'expression de SREBP-1c. Chez des sujets obèses morbides ayant subi une chirurgie bariatrique, la réduction du risque cardio-vasculaire après une perte de poids massive, est associée à une amélioration de l'insulino-sensibilité musculaire et une chute de la concentration en TGIM. Ces deux paramètres sont eux-mêmes corrélés à une réduction

significative de l'expression de SREBP-1c dans le muscle squelettique, suggérant l'implication de SREBP-1c dans l'accumulation lipidique au sein des cellules musculaires des sujets insulino-résistants (Mingrone *et al.* 2003).

SREBP-1c pourrait donc participer activement au développement et au maintien de l'insulino-résistance musculaire.



**Figure 50:** Expression musculaire de SREBP-1c chez les sujets insulino-résistants

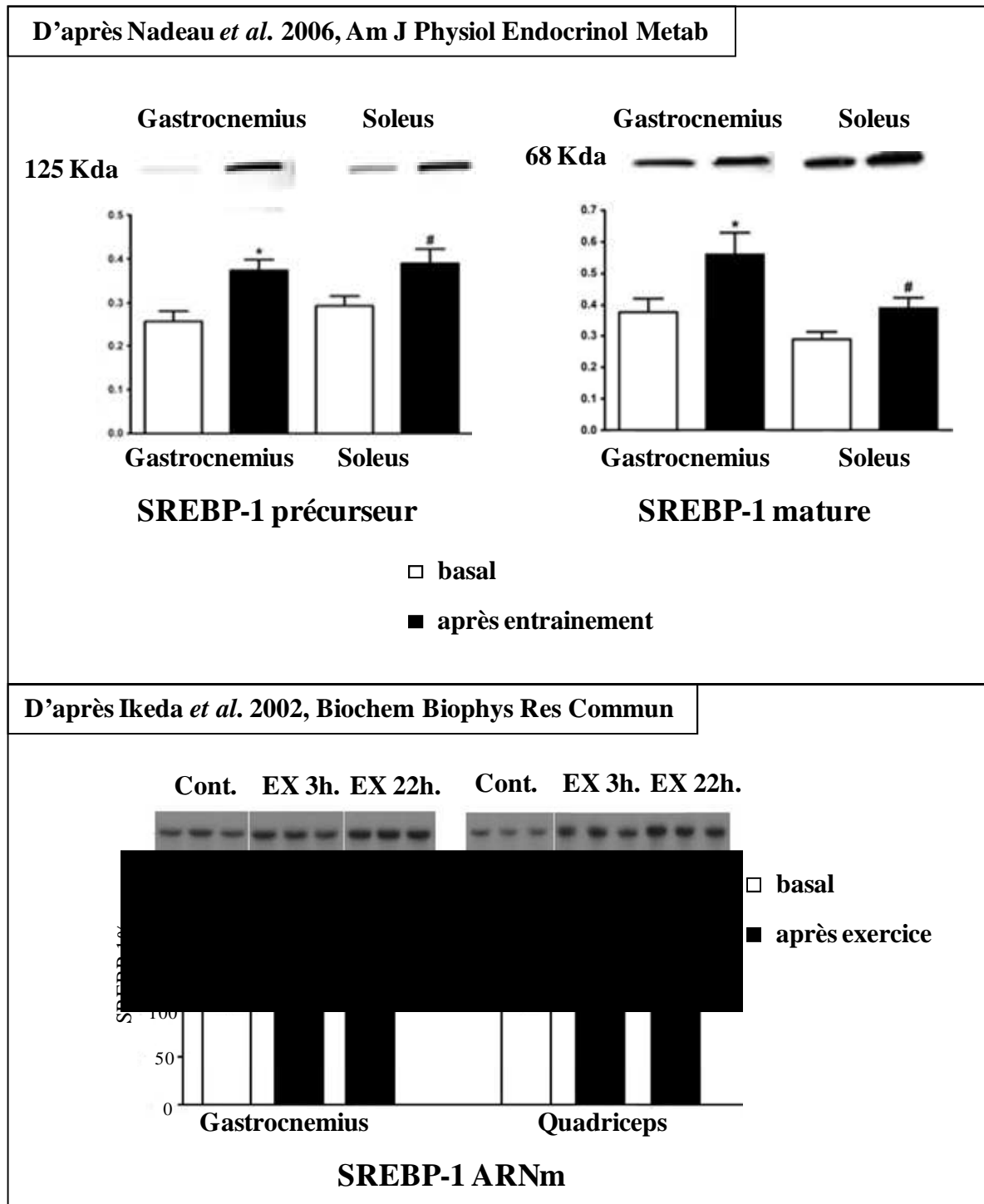
### 3.2.3. Influence de l'exercice sur l'expression musculaire de SREBP-1c

L'accumulation de lipides intracellulaires pourrait être à l'origine de l'insulino-résistance musculaire associée à l'obésité et au diabète de type 2. En effet, les muscles de patients obèses et DT2 insulino-résistants présentent des taux élevés de TGIM. De façon surprenante, un taux élevé de TGIM est également retrouvé dans le muscle d'athlètes entraînés en endurance, marathoniens, coureurs de longues distances, alors que ces sujets présentent une insulino-sensibilité grandement améliorée par rapport à des sujets sédentaires. Durant l'exercice, d'importantes quantités d'énergie sont consommées pour la contraction musculaire. Le glycogène est la source primaire d'énergie pour le muscle squelettique. Mais au cours d'un exercice prolongé, le muscle utilise les acides gras comme source d'énergie secondaire (Kiens *et al.* 1993). L'entraînement en endurance induit de nombreuses adaptations du métabolisme musculaire, incluant une augmentation des capacités d'oxydation des acides gras, facilitée par un captage accru des acides gras libres sanguins dans les myocytes (Mole *et al.* 1971). Le muscle squelettique des athlètes d'endurance présente donc un taux élevé de TGIM, malgré des capacités d'oxydation accrue et une meilleure insulino-sensibilité. Pour expliquer ce paradoxe, Goodpaster *et al.* suggèrent que ce sont les défauts d'oxydation lipidiques, plus que les TGIM eux-mêmes, qui contribue à l'état insulino-résistance (Goodpaster *et al.* 2001).

L'augmentation des TGIM par l'exercice est reportée par plusieurs groupes (Morgan *et al.* 1969; Hoppeler *et al.* 1985; Pruchnic *et al.* 2004). Cependant, le mécanisme par lequel l'exercice favorise l'accumulation lipidique intracellulaire est encore mal compris.

Une des possibilités avancées, est la stimulation de la lipogenèse de novo dans le muscle squelettique par SREBP-1c. Ainsi, deux équipes montrent un effet positif de l'exercice sur l'expression de SREBP-1c (Figure 51). D'abord, Ikeda *et al.* (Ikeda *et al.* 2002) montrent qu'un exercice prolongé, 6 heures de course sur tapis roulant réparties en 8 fois 45 minutes, provoque une élévation de l'expression musculaire de SREBP-1c dans le muscle squelettique de rat. De plus, Ikeda *et al.* ainsi que Nadeau *et al.* (Nadeau *et al.* 2006), montrent qu'un entraînement en endurance sur plusieurs semaines, augmente la stimulation de l'expression de SREBP-1c dans le muscle squelettique en réponse à l'exercice, par rapport à des rongeurs non entraînés. L'expression de SREBP-1c dans le muscle des animaux entraînés reste plus élevée jusqu'à 22h après l'exercice. L'expression des gènes cibles de SREBP-1c,

tels que *FAS*, *ACCI*, *SCD1* ou *DGAT-1*, est stimulée au cours de l'exercice, de façon parallèle à SREBP-1c.



**Figure 51:** Effet de l'exercice sur l'expression de SREBP-1

L'insulinémie ne varie pas au cours de ces exercices. L'insuline ne participe donc pas aux effets de l'exercice sur l'activation de l'expression de SREBP-1c. Dans le muscle squelettique, l'expression de SREBP-1c est stimulée par l'insuline via la voie des MAPKinases. Or, cette voie est également activée au cours de l'exercice.

En effet, la phosphorylation des protéines kinases ERK-1/2 augmente dans le muscle squelettique humain au cours d'exercices aigües et de courses de marathon (Widegren *et al.* 1998; Yu *et al.* 2001; Yu *et al.* 2003). Il s'agit d'un effet local et non systémique de la contraction musculaire, se produisant uniquement dans le membre ayant subi l'exercice (Widegren *et al.* 1998). Cette observation est confirmée *in vitro* sur des muscles isolés de rat, soumis à une stimulation électrique (Ryder *et al.* 2000; Wretman *et al.* 2001). La contraction pourrait donc stimuler l'expression de SREBP-1c par la voie des MAPKinases. L'entraînement pourrait ainsi favoriser l'accumulation de TGIM, via l'activité lipogénique de SREBP-1c.

Cette hypothèse est toutefois contestée par plusieurs études chez l'homme. Ainsi, chez des sujets sains non entraînés, un exercice à 50% de VO<sub>2</sub> max pendant deux heures dans une première étude, ou une heure de vélo stationnaire dans une seconde étude, n'induit aucun changement dans l'expression musculaire de SREBP-1c (Tunstall *et al.* 2002b; Russell *et al.* 2005). De façon concordante, un entraînement en endurance de 9 jours sur des sujets sains, n'améliore pas l'expression de SREBP-1c en réponse à l'exercice (Tunstall *et al.* 2002b).

Toutes ces études sont néanmoins difficilement comparables, le type d'exercice, leur durée et l'entraînement subi par les sujets étant, à chaque fois, différents. Ikeda *et al.* montrent que l'activation de l'expression de SREBP-1c en réponse à l'exercice dépend de la durée de celui-ci. Si 6 h de course sur tapis roulant permettent un doublement de l'expression musculaire de SREBP-1c, une heure seulement du même exercice n'a aucun effet (Ikeda *et al.* 2002). De plus, la réponse de SREBP-1c à l'exercice peut nécessiter un délai pour se mettre en place, et donc n'apparaître que bien après l'exercice. Ainsi, une étude soumet une seule jambe de sujets sains à un exercice de 90 minutes. Tout de suite après l'exercice, Boonsong *et al.* observent dans cette jambe une diminution de l'expression de SREBP-1c par rapport à la jambe au repos. Mais, 24h après l'exercice, la jambe entraînée présente une expression de SREBP-1c plus élevée que la jambe au repos (Boonsong *et al.* 2007).

Chez des sujets obèses les TGIM sont très élevés. Le mécanisme mis en cause est l'augmentation de l'expression de SREBP-1c en réponse à l'hyperinsulinémie provoquée par

l'insulino-résistance périphérique. Quel est l'effet de l'exercice sur le métabolisme musculaire de ces sujets? C'est la question à laquelle répond une récente étude, dans laquelle des sujets obèses ou en surpoids, dyslipidémiques et sédentaires sont soumis à un entraînement en endurance. Comme attendu, l'expression de SREBP-1c dans le muscle squelettique des sujets obèses ou en surpoids est plus élevée que dans celui de sujets sains. L'entraînement en endurance améliore l'insulino-sensibilité de ces sujets. Le taux de TGIM ainsi que l'expression de SREBP-1c sont diminués dans le muscle squelettique des sujets obèses entraînés (Smith *et al.* 2009). Ainsi, chez des sujets obèses insulino-résistants, l'exercice diminue l'expression basale de SREBP-1c dans le muscle squelettique.

SREBP-1c est l'isoforme de SREBP dont la régulation par l'exercice est la plus étudiée, car, contrairement à SREBP-1a et SREBP-2 exprimé de façon constitutive *in vivo*, l'expression de SREBP-1c est sensible aux variations métaboliques.

Cependant, l'analyse transcriptomique par puce ADN, d'échantillons de muscle humain ayant subi un exercice excentrique, révèle une rapide induction de SREBP-2 3 heures après ce type d'exercice, alors que l'expression de SREBP-1c ne varie pas (Mahoney *et al.* 2008). De nombreux gènes cibles de SREBP-2 sont également régulés au cours de l'exercice, tels que *ACAT2* et *SCD1*, codant pour des enzymes impliquées dans le métabolisme du cholestérol. Il s'agit ici d'un type d'exercice particulier au cours duquel la jambe d'un sujet est soumise à des rotations excentriques. Ce type d'exercice est utilisé de façon expérimentale afin de causer des microlésions musculaires. Un processus de régénération musculaire se met donc en place afin de réparer ces lésions. SREBP-2 pourrait participer à ce processus en participant à la synthèse membranaire nécessaire à la croissance cellulaire, en activant la synthèse de novo de cholestérol.

## 4. Conclusion

Grâce à son extrême plasticité, le muscle s'adapte constamment à la demande énergétique de l'organisme, modulée par les apports alimentaires et l'activité physique. Ces adaptations se font tant sur la masse musculaire dans son ensemble que sur le phénotype contractile et métabolique des fibres musculaires. Ces adaptations sont orchestrées par des modulations transcriptionnelles des gènes muscle-spécifiques, codant aussi bien pour les protéines myofibrillaires que pour les enzymes métaboliques spécifiques du muscles (HKII, CK).

Les facteurs de transcription de la famille bHLH sont des acteurs essentiels de la plasticité musculaire.

Les MRF, bHLH de la famille MyoD, sont les instigateurs principaux du développement musculaire, seuls capables d'activer le programme myogénique. A l'âge adulte, ils participent à la plasticité musculaire, notamment en déterminant le phénotype des fibres musculaires, régulant de façon coordonnée l'expression des différents types de myosine et des enzymes du métabolisme oxydatif ou glycolytique.

Les répresseurs transcriptionnels BHLHB2 et BHLHB3, facteurs bHLH de classe B, semblent intervenir également dans le processus myogénique. BHLHB3 apparaît comme un facteur inhibiteur de la différenciation myogénique alors que BHLHB2 apparaît impliqué dans l'activation des cellules satellites. Tous deux sont également impliqués dans les régulations métaboliques du muscle squelettique.

Enfin, les facteurs de transcription bHLH-LZ, SREBP-1 jouent un rôle fondamental dans la régulation du métabolisme glucido-lipidique du muscle squelettique. Leur expression répond aussi bien à la régulation hormonale de l'insuline qu'aux variations nutritionnelles, et à l'activité physique. SREBP-1 apparaît donc lui aussi comme un acteur de la plasticité musculaire. S'il régule de façon évidente le phénotype musculaire métabolique, aucune donnée n'est disponible sur son rôle potentiel dans la régulation de l'expression des gènes muscle-spécifiques, du phénotype musculaire contractile ou du programme myogénique.





# **TRAVAUX PERSONNELS**



## PRESENTATION DU TRAVAIL DE THESE

Les facteurs de transcription SREBP-1 sont identifiés pour la première fois dans le foie en tant que facteur régulant la réponse génique aux stérols et dans le tissu adipeux en tant que facteur de différenciation adipocytaire (Briggs *et al.* 1993; Tontonoz *et al.* 1993; Wang *et al.* 1993). C'est donc naturellement dans ces organes que les fonctions de SREBP-1a et SREBP-1c ont été d'abord décrites. Ils sont caractérisés comme des régulateurs majeurs du métabolisme lipidique, induisant la lipogenèse et dans une moindre mesure la synthèse de cholestérol (Brown and Goldstein 1998). Dans la plupart des organes, l'isoforme SREBP-1c est largement majoritaire, l'expression de SREBP-1a étant faible (Shimomura *et al.* 1997). L'expression de SREBP-1c dans le foie et le tissu adipeux répond aux variations nutritionnelles et est activée par l'insuline, *in vitro* comme *in vivo*. De plus, SREBP-1 induit directement l'expression de nombreux gènes cibles de l'insuline. SREBP-1c est donc considéré comme le médiateur principal des effets transcriptionnels de l'insuline dans le foie et le tissu adipeux (Kim *et al.* 1998a; Foretz *et al.* 1999a).

C'est à ce titre que notre équipe de recherche s'est d'abord intéressée à la contribution de SREBP-1 dans l'action de l'insuline sur le muscle squelettique et dans les mécanismes de l'insulino-résistance. Le muscle squelettique est le troisième organe insulino-sensible, avec le foie et le tissu adipeux, et l'insulino-résistance musculaire est à l'origine du diabète de type 2. Les protéines SREBP sont également exprimées dans le muscle squelettique. Comme dans les autres organes, SREBP-1c est l'isoforme majoritaire, toutefois l'expression de SREBP-1a dans les fibres musculaires rejoint celle de SREBP-1c (Shimomura *et al.* 1997; Gosmain *et al.* 2005). Les travaux menés au laboratoire confirment l'expression de SREBP-1a et SREBP-1c dans le muscle squelettique humain et montre que l'expression musculaire de SREBP-1c, mais pas celle de SREBP-1a, est stimulée *in vivo* par l'insuline (Ducluzeau *et al.* 2001). L'augmentation de l'expression de SREBP-1c en réponse à l'insuline semble résulter de l'activité transcriptionnelle même de SREBP-1c et de SREBP-1a (Dif *et al.* 2006). Cette réponse de SREBP-1c à l'insuline est altérée dans le muscle de patients diabétiques de type 2. De plus, notre équipe de recherche a mis en évidence l'implication directe de SREBP-1c dans la régulation de gènes clé du métabolisme glucidique, HKII et lipidique, FAS, en réponse aux changements nutritionnels et à la sécrétion d'insuline (Gosmain *et al.* 2004; Gosmain *et al.* 2005). Dans le muscle squelettique, SREBP-1 apparaît donc comme un acteur majeur non

seulement dans le métabolisme lipidique mais aussi dans le métabolisme des glucides et l'homéostasie énergétique.

Ces résultats nous ont amené à supposer la possible implication des facteurs SREBP-1 dans d'autres fonctions musculaires essentielles. Mon travail de thèse a eu pour but de mettre en évidence le rôle spécifique de SREBP-1 dans le muscle squelettique et d'étudier son implication dans le contrôle du phénotype musculaire, au-delà de la régulation métabolique.

Dans un premier temps, pour nous permettre de mieux caractériser le rôle de SREBP-1 dans le muscle squelettique, une étude transcriptomique a été réalisée sur des myotubes humains surexprimant SREBP-1a ou SREBP-1c, afin de mettre en évidence l'ensemble des gènes régulés par SREBP-1 dans le muscle squelettique humain. Cette étude fait l'objet d'une publication en co-premier auteur dans *Physiological Genomics* (Rome, Lecomte *et al.* 2008).

Ce premier article désignant plusieurs gènes muscle-spécifiques comme gènes cibles de SREBP-1a et SREBP-1c, nous nous sommes alors intéressé au rôle de SREBP-1a et SREBP-1c dans la myogenèse et le contrôle de la masse musculaire. En parallèle, nous avons mis en évidence de nouvelles cibles directes de SREBP-1 dans le muscle squelettique : les répresseurs transcriptionnels BHLHB2 et BHLHB3. Nous avons ensuite cherché à démontrer l'implication de ces répresseurs transcriptionnels dans l'inhibition de gènes muscle-spécifiques au cours de la surexpression de SREBP-1a ou SREBP-1c. Ces travaux ont été soumis pour publication en premier auteur à *Molecular Cell Biology*.

Enfin, une étude transcriptomique réalisée à partir de muscles de patients diabétiques de type 2 soumis à un clamp hyperinsulinémique-euglycémique, a permis de révéler l'implication de BHLHB2 dans les mécanismes de l'insulino-résistance musculaire. Cette étude fait l'objet d'une publication en co-auteur dans *Diabetologia* (Rome *et al.* 2009).

# MATERIELS ET METHODES

## 1. Modèles cellulaires

### 1.1. Cellules musculaires humaines en culture primaire

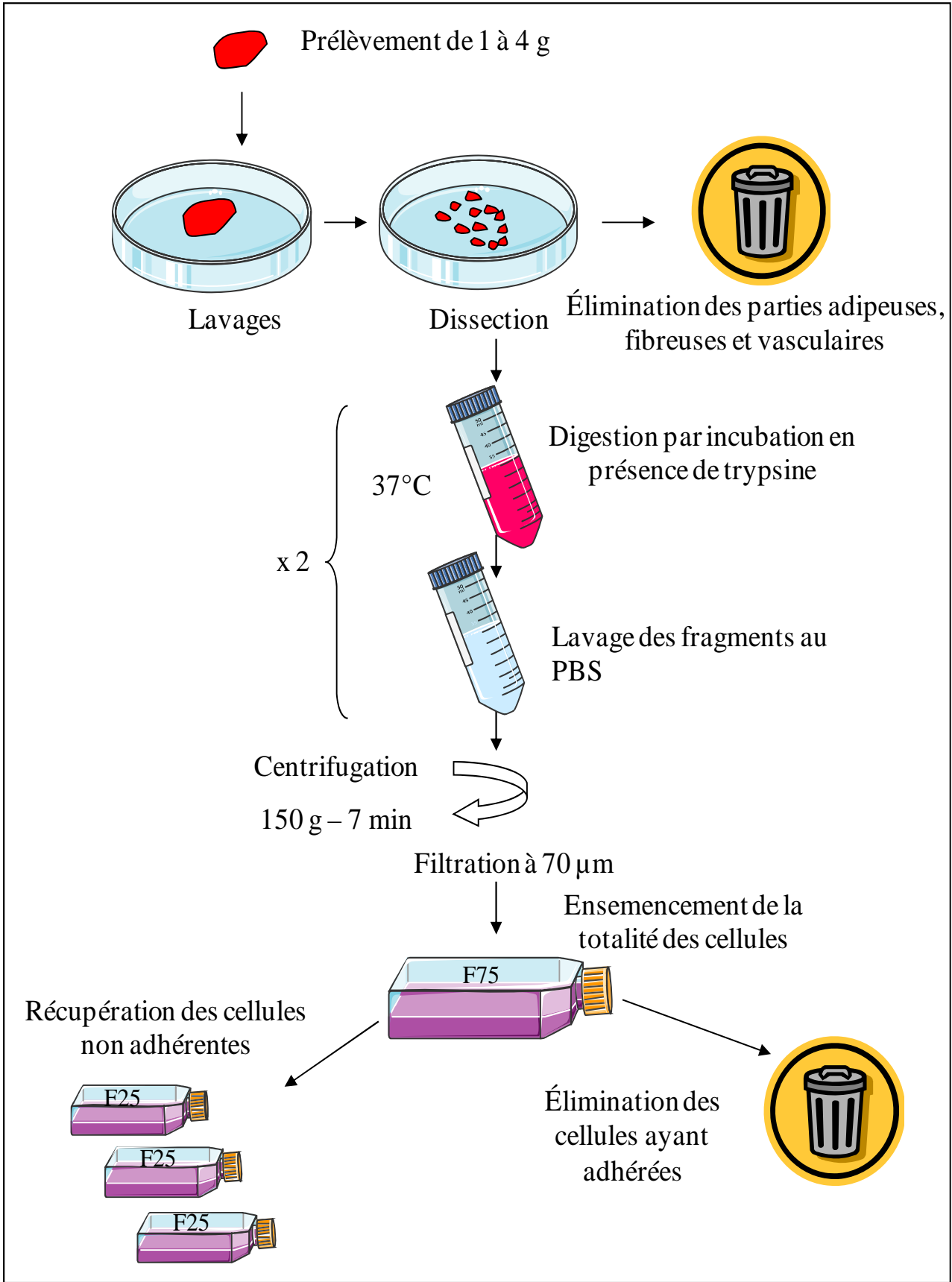
Nous disposons au laboratoire d'une banque de cellules musculaires humaines conservées dans l'azote liquide. Ce sont, en fait, des cellules satellites isolées à partir de prélèvements musculaires réalisés par biopsies lors d'interventions chirurgicales. Une fois mises en culture, ces cellules satellites prolifèrent puis se différencient en myotubes, recréant ainsi *in vitro* les étapes de la différenciation musculaire.

#### 1.1.1. Matériel

Deux types de milieu sont utilisés pour la culture des cellules musculaires humaines :

- Un milieu de prolifération composé d'Ham-F10 (Invitrogen) supplémenté de 2% d'Ultrosér G (Biopre), 2% de sérum de veau fœtal (SVF) et 1% d'antibiotique, pénicilline, streptomycine et antimycotique, fungizone (Invitrogen).
- Un milieu de différenciation, composé de Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Invitrogen) contenant 1g/L de glucose, supplémenté de 2% de SVF, 2% de sérum de cheval et 1% d'antibiotique-antimycotique

Les cellules sont cultivées dans des flasques F25 de type Primaria™ (le traitement Primaria™ consiste à donner au plastique une charge opposée à celle des membranes cellulaires afin d'augmenter l'adhérence des cellules), puisensemencées dans des plaques de culture dont les puits sont recouverts de collagène I (Becton-Dickinson Bioscience).



**Figure 52 : Protocole d'isolement des cellules musculaires à partir de biopsie**

### **1.1.2. Mise en Culture et Sélection des cellules musculaires**

Des prélèvements musculaires sont effectués lors d'interventions chirurgicales (traumatismes d'origine non musculaires), sur des déchets opératoires obtenus chez des patients volontaires, conformément à l'accord du Comité d'Ethique des Hospices Civiles de Lyon.

Les cellules sanguines sont éliminées par lavage avec du milieu de prolifération. Les tissus non musculaires sont éliminés par dissection. Le prélèvement est fragmenté puis digéré à 37°C en présence de trypsine. La suspension cellulaire ainsi obtenue est lavée dans du PBS pour éliminer les résidus de la biopsie, puis culottée par centrifugation. Le culot cellulaire est repris dans du milieu de prolifération et les cellules ensemencées dans des flasques F25 Primaria (Figure 52).

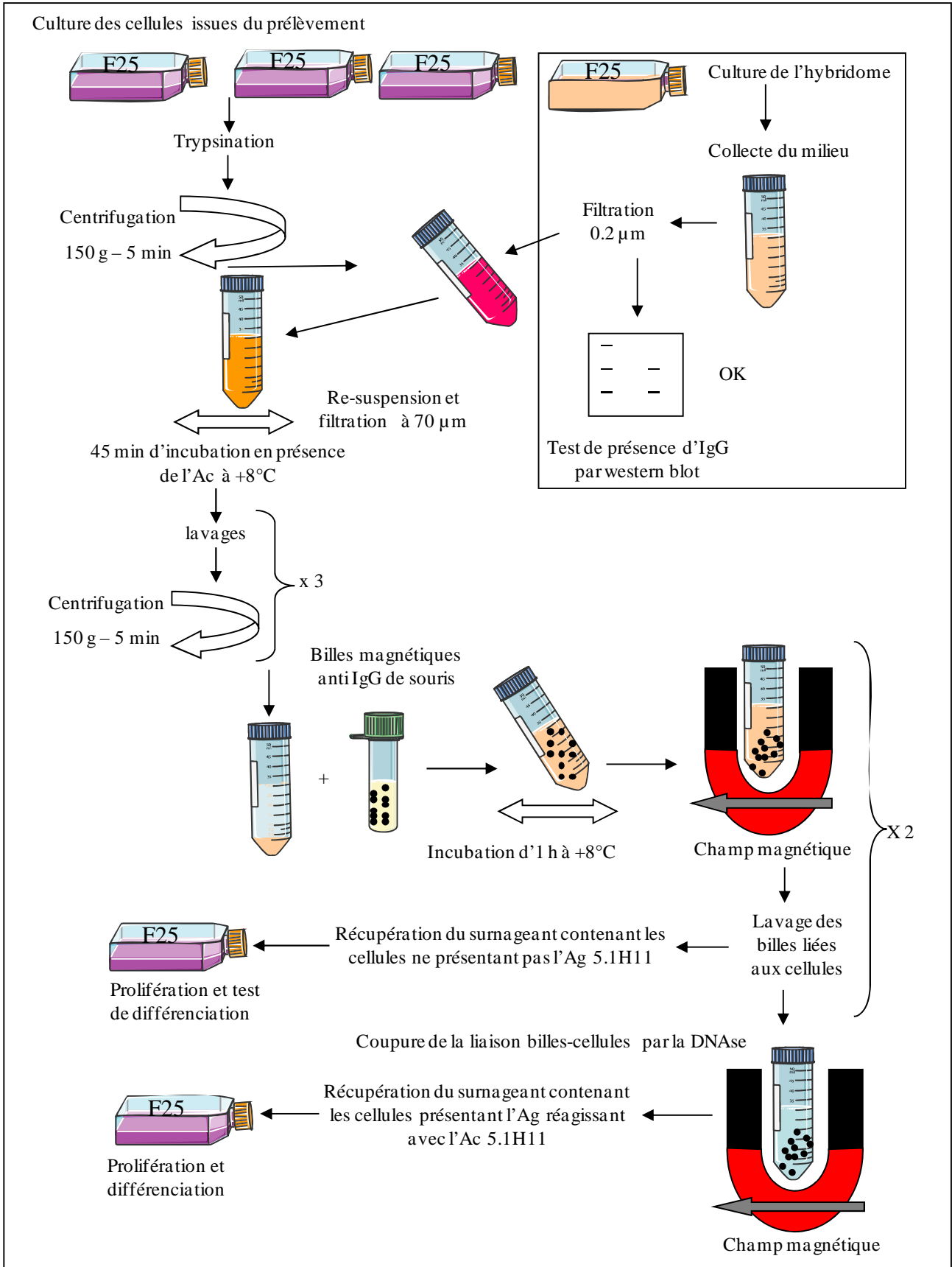
La sélection des cellules musculaires est réalisée au moyen de l'anticorps 5.1H11 décrit par Walsh et Ritter (Walsh and Ritter 1981). Cet anticorps est dirigé contre un antigène de surface spécifique des cellules musculaires. Il a été obtenu par immunisation de souris avec des cellules satellites humaines (Figure 53).

Après prolifération de la population cellulaire totale, les cellules trypsinées sont mises en contact de l'anticorps 5.1H11 dans 15 mL de milieu de culture de l'hybridome (Developmental Studies Hybridoma Bank, n° 93208) pendant 45 minutes.

La sélection des cellules liées à l'anticorps 5.1H11 est réalisée à l'aide de billes magnétiques couplées à des anticorps IgG de souris (Milteny). Au cours d'une incubation de 15 minutes, les billes se fixent à l'anticorps 5.1H11 lui-même lié aux cellules musculaires. La purification des cellules est ensuite réalisée par sélection magnétique.

Les cellules sélectionnées sont ensemencées dans des F25 Primaria™ et incubées à 37°C, 5% CO<sub>2</sub> en présence de milieu de prolifération.





**Figure 53: Purification des cellules musculaires humaines**

### **1.1.3. Obtention de myotubes polynucléés**

Après isolement et sélection, les cellules sont ensemencées dans des plaques dont les puits sont recouverts de collagène de type I. L'état de confluence est contrôlé par observation microscopique. L'état de confluence ainsi qu'une diminution de la concentration en sérum du milieu de culture (2% de SVF et 2% de sérum de cheval) va induire la différenciation des myoblastes.

Cette étape se caractérise par un allongement et un alignement des cellules puis par la fusion des myoblastes formant ainsi des myotubes polynucléés contractiles. Le processus de différenciation débute dès la confluence et l'obtention de fibres polynucléées est effective 48h après l'induction de la différenciation. Les différentes études sont menées 4 à 7 jours après l'induction de la différenciation.

Au cours de la différenciation, des études par immunocytofluorescence ont montré une expression significative de la myosine ainsi que la présence de l'antigène de surface spécifique des cellules musculaires (5.1H11) utilisé pour la sélection.

D'autres part, des travaux réalisés au laboratoire ont montré que les myotubes différenciés exprimaient les ARNm de plusieurs gènes impliqués dans le métabolisme musculaire à des niveaux similaires à ceux observés dans le muscle squelettique (HKII, glycogène synthase, transporteur d'acide gras CD34, UCP-2, récepteurs nucléaires PPAR $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , LXR $\alpha$ ,  $\beta$ , et le facteur de transcription SREBP-1c) (Roques and Vidal, 1999 ; Chevillotte et al 2001 ; Gosmain et al 2004) . Néanmoins certains gènes, et notamment le transporteur de glucose GLUT4, UCP3 et CPT1m sont faiblement exprimés dans les cellules isolées suggérant que le processus de différenciation n'est pas total.

## **1.2. Lignées cellulaires humaines**

### **1.2.1. Lignée HEK 293**

Les cellules HEK 293 (Human Embryo Kidney 293) dérivent de cellules embryonnaires humaines de rein, issues d'un fœtus sain avorté. Ces cellules ont été immortalisées par transformation avec de l'ADN fragmenté d'adénovirus de type 5 (Graham et al, 1977). Leur origine cellulaire étant mal définie, ces cellules ne représentent pas un

modèle d'étude physiologique particulier. Par contre, leur grande capacité à proliférer et leur facilité à être transfectées, en font un outil très intéressant en biologie moléculaire.

Elles sont également utilisées pour l'amplification d'adénovirus. Les adénovirus que nous utilisons comme vecteur d'expression, sont rendus inoffensifs par délétion de plusieurs gènes clé de la réplication (cf § II-A). Les HEK293 expriment un certains nombres de ces gènes adénoviraux, notamment E1 et E3, et permettent la réplication des adénovirus incomplets. Elles sont dites complémentantes.

Les HEK 293T, sont une sous-lignée de HEK, exprimant l'antigène SV40 Large T (Simian Vacuolating Virus 40), nécessaire à l'amplification des plasmides transfectés contenant l'origine de réplication du SV40 (ex : PCDNA3).

Les HEK sont cultivées dans du milieu DMEM contenant 4,5 g/L de glucose, supplémenté de 5% de SVF et 1% d'antibiotique-antimycotique, à 37°C dans une atmosphère de 5% de CO<sub>2</sub>.

### **1.2.2. Lignée HepG2**

Les cellules HepG2 (Hepatocellular carcinoma) sont issues d'un hépatocarcinome bien différencié isolé à partir du foie d'un sujet masculin de 15 ans. Elles présentent une morphologie de type épithéliale. Ces cellules sont les plus couramment utilisées pour l'étude des fonctions hépatocytaires, et notamment, la régulation par les cytokines de la synthèse protéique dans le foie.

Nous les utilisons ici comme modèle de cellules humaines non musculaires.

Ces cellules sont cultivées dans du milieu DMEM contenant 4,5g/l de glucose, supplémenté de 10% de SVF et 1% antibiotique-antimycotique.

## 2. Modulation de l'expression de protéines d'intérêt *In vitro*

### 2.1. Mise au point d'adénovirus recombinants

Les adénovirus sauvages sont responsables d'affections légères chez l'homme, comme des infections respiratoires chez les personnes âgées ou chez les enfants.

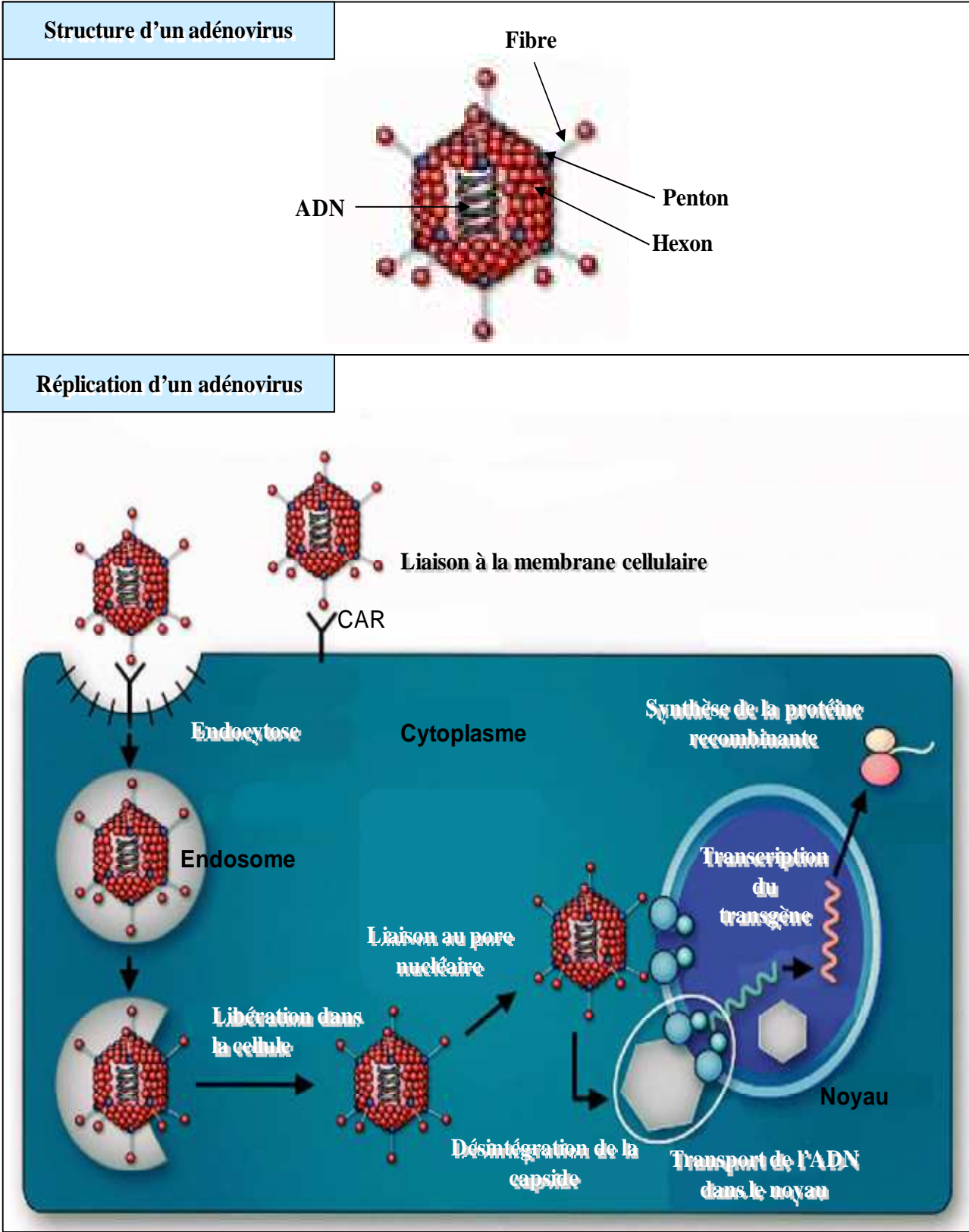
Ces virus, découverts en 1953 par W.P. Rowe, avaient été initialement isolés à partir des tissus adénoïdiens (amygdales), d'où le nom adénovirus.

Les adénovirus sont des virus non enveloppés à capsidie icosaédrique d'un diamètre d'environ 80 nanomètres. La capsidie comporte 252 capsomères : 12 pentons aux sommets de l'icosaèdre et 240 hexons situés sur les arêtes et les faces. Chaque penton porte un spicule glycoprotéique, appelé fibre, terminé par une sphère de 4 nm de diamètre qui possède une activité hémagglutinante. Cette fibre permet la liaison du virus à la surface de la cellule hôte via un récepteur (Figure 54).

Le principal récepteur humain pour les adénovirus est le Coxsackie/Adenovirus Receptor (CAR). La fixation du virus à ce récepteur et à une molécule d'intégrine entraîne son endocytose dans la cellule. Une fois entré dans la cellule, le virus se fixe aux microtubules cellulaires pour migrer vers les pores nucléaires, via lesquels l'ADN viral est relargué dans le noyau, après désintégration de la capsidie (Figure 54).

Le génome adénoviral est un ADN bicaténaire d'environ 36 Kb. On distingue au sein du génome des régions codant pour des protéines précoces dites E et des protéines tardives dites L, suivant qu'elles sont exprimées en début ou fin de réplication du virus.

Il existe 4 régions codant pour les protéines E : Les produits du gène E1 (E1A et E1B) sont impliqués dans la réplication du virus. La région E2 contient des gènes de la réplication de l'ADN et de l'expression des régions tardives, les protéines de la région E3 sont impliquées dans la réponse immunitaire, et ceux de E4 dans le métabolisme de l'ARNm viral.



**Figure 54:** Structure d'un adénovirus et Infection cellulaire

### 2.1.1. Construction d'adénovirus recombinants ( $\Delta E1/E3$ )

En biologie moléculaire, les adénovirus sont utilisés comme vecteur de gène d'intérêt, permettant la surexpression de protéines, notamment dans des cellules difficilement transfectables par les méthodes classiques. Les adénovirus les plus couramment utilisés sont les adénovirus humains de classe 5.

Afin d'éviter leur propagation, les adénovirus utilisés en laboratoire sont rendus incapables de réplication par la délétion de la région E1. La région E3, non essentielle lors de la culture *in vitro* de l'adénovirus, est également délétée afin de permettre l'insertion de transgènes comprenant jusqu'à 8Kb.

L'adénovirus utilisé au laboratoire, VmAdcDNA3, a été mis au point par l'équipe du Dr S. Rusconi à l'université de Fribourg en Suisse (Chaussade *et al.* 2003). Il est issue d'un adénovirus humain de type 5 recombinant  $\Delta E1/E3$ . Une région de recombinaison homologue avec le plasmide pCDNA3.1 a été ajoutée au niveau de la région E1 délétée. Il s'agit de deux éléments correspondant à une portion de 363bp en 5' du promoteur CMV (cytomégalovirus) et un segment de la région 3' comprenant le signal de polyadénylation du plasmide pCDNA3. Ces deux éléments sont séparés par une séquence contenant un site de restriction *SwaI*. Ainsi la recombinaison doit, d'une part, supprimer le site de restriction *SwaI* mais également entraîner la reformation du promoteur CMV, ce qui peut-être vérifié par PCR.

Les gènes d'intérêts doivent donc d'abord être clonés dans le pCDNA3 avant d'être transférés par recombinaison homologue dans le VmAdcDNA3.

#### a) Clonage des gènes humains codant pour SREBP-1a, SREBP-1c, BHLHB2, BHLHB3

Les vecteurs d'expression pCMV-hSREBP-1a et pCMV-hSREBP-1c, codant pour les formes nucléaires humaines de SREBP-1a et SREBP-1c, ont été réalisés par Nicolas Dif (Dif *et al.* 2006). Un amplicon de chaque gène a été généré par PCR à partir d'ADN génomique humain grâce aux amorces suivantes :

pCMV-hSREBP-1a : 5'- GGCTGCGCCATGGACGAGCCAC – 3'

5'- AGCGGTCCAGCATGCCCCGGCTGTGC -3'

pCMV-hSREBP-1c : 5'- GCAGATCGCGGAGCCATGGATTGC-3'

5'- AGCGGTCCAGCATGCCCCGGCTGTGC-3'.

Les produits de PCR ont été ensuite clonés dans un plasmide pGEMT (Promega, Charbonnière, France), puis transférés par restriction-ligation dans le pCDNA3.1 (Invitrogen, Cergy Pontoise, France).

Pour la réalisation du vecteur d'expression porteur du gène humain codant pour BHLHB2, pCDNA3-B2, un clone I.M.A.G.E. (cloneID 4860809) a été commandé auprès de la société Geneservice (Cambridge, Angleterre). L'ADNc codant pour BHLHB2 a été extrait du clone Geneservice par restriction enzymatique, sous-cloné dans les plasmides pBluescript KS+ et pGL3-Enhancer (Promega), puis transféré dans le pCDNA 3.1.

Pour la construction du vecteur d'expression pCDNA3-B3, codant pour BHLHB3 humain, deux fragments, correspondant à la région 5' et la région 3' du gène humain, ont été générés par PCR à partir d'ADN génomique humain. Les produits de PCR ont été clonés dans le pGEMT-easy, puis transférés par restriction-ligation dans le pCDNA3.1.

Afin d'obtenir des vecteurs exprimant à la fois le gène d'intérêt et la protéine GFP, Green Fluorescent Protein, comme marqueur d'expression, une portion du plasmide pIRES (Clontech, Mountain View, CA, USA) contenant les séquences IRES ( internal ribosome entry site), permettant la traduction de deux cadres ouverts de lecture dans un même ARNm, et E-GFP, codant pour la GFP, a été insérée dans les vecteurs d'expression pCMV-hSREBP-1a, pCMV-hSREBP-1c, pCDNA3-B2 et pCDNA3-B3.

#### **b) Génération des Adénovirus recombinant codant pour SREBP-1a, SREBP-1c, BHLHB2 et BHLHB3**

Une fois le gène d'intérêt cloné dans le pCDNA3, celui-ci est transféré dans le génome adénoviral par recombinaison homologe. Pour cela, 200ng de VmAdcDNA3 est linéarisé par l'enzyme de restriction SmaI. 600ng des clones pCDNA3+ gène d'intérêt sont également linéarisés par une enzyme de restriction ne coupant pas dans la cassette « promoteur CMV-Gène-polyA  $\beta$ -Globine » du plasmide.

Des bactéries compétentes Rec+ (exprimant la recombinase), *Escherichia coli* BJ5183, sont co-transformées par le VmAdcDNA3 linéarisé et le pCDNA3+insert linéarisé, puis étalées sur des boîtes de pétri recouvertes de milieu LB traité à l'ampicilline.

Une PCR est réalisée sur les clones sélectionnés afin de vérifier la recombinaison, devant permettre la reformation du promoteur CMV. Les amorces utilisées sont :

- primer A : 5'- GACGGATGTGGCAAAAAGTGA- 3', s'hybridant à l'extrémité 5' de l'adénovirus
- primer B : 5'-ATGGGGTGGAGACTTGGAAATC-3', s'hybridant à la région du promoteur CMV complétée par recombinaison.

Un fragment de 700bp est généré à partir des clones positifs. Un clone positif est ensuite amplifié dans des bactéries *Escherichia coli* XL1-Blue.

Le plasmide ainsi obtenu est digéré par l'enzyme de restriction PacI, ce qui permet l'exclusion de la cassette bactérienne de la construction, et sa transfection dans les cellules HEK293.

La production in-vitro du virus recombinant n'est possible que dans les cellules HEK 293, qui sont des cellules modifiées génétiquement pour pouvoir compléter les génomes viraux par la production des protéines E1 et permettre ainsi la multiplication des adénovirus. Ces cellules sont donc transfectées, par méthode au phosphate de calcium, avec le plasmide coupé PacI. Les effets cytopathiques, provoqués par la production adénovirale au sein des cellules, sont observés pour évaluer le degré d'infection cellulaire.

Lorsque les cellules sont sur le point de s'auto-lysées, 36 à 40h après l'infection, elles sont récoltées par trypsination et centrifugation, puis lysées par cycles de congélation-décongélation successifs, afin de récupérer la solution adénovirale. La capacité de l'adénovirus ainsi produit à induire une surexpression de la protéine d'intérêt (ici, SREBP-1a, SREBP-1c, BHLHB2 ou BHLHB3) est vérifiée par Western Blot, après 48h d'infection cellulaire.

### **c) Amplification de l'adénovirus**

Afin d'obtenir un titre infectieux plus élevé, les adénovirus SREBP-1a, SREBP-1c, BHLHB2 et BHLHB3 ont été amplifiés dans les HEK 293 et purifiés sur gradient de Chlorure de Césium.

Brièvement, une première série de 6 plaques 10cmensemencées avec des HEK 293 sont infectées par l'adénovirus. Après l'auto-lyse complète des cellules, environ 48h après l'infection, le milieu de culture est collecté et subit plusieurs cycles de congélation-



décongélation afin de lyser les cellules encore entières. Cette solution adénovirale sert à son tour pour infecter une série de 10 flasques à triple-étage F185 (Triple Flask Fitre, NUNC). Lorsque les cellules de cette deuxième série sont sur le point d'être lysées, elles sont récoltées et subissent plusieurs cycles de congélation-décongélation afin de libérer les adénovirus produits.

Les adénovirus sont ensuite isolés par ultracentrifugation (35 000 RPM) sur gradient croissant de chlorure de césium (1,25 ; 1,34 ; 1,40 unité ???). Une fois isolés, ils sont purifiés à l'aide de cassettes de dialyses (Slide A Lyzer Dialysis, Pierce Biotechnology, Inc (Rockford, IL, USA)). La dialyse est réalisée dans un tampon de composition suivante : Saccharose 1M; NaCl 150 mM ; MgCl<sub>2</sub> 10 mM ; Tris 10 mM ; Tween 54 mg/l ; pH 8,5.

La solution d'adénovirus ainsi obtenue est conservée sous forme d'aliquotes à -80°C.

#### **d) Titration**

La titration de la solution adénovirale consiste à déterminer le titre infectieux de la solution, c'est-à-dire, la concentration de la solution en adénovirus capables d'infecter une cellule.

La titration est réalisée sur des cellules HEK 293, ensemencées en plaques 12 puits. Ces cellules sont infectées par des dilutions croissantes de la solution mère d'adénovirus ( $10^{-2}$  à  $10^{-8}$ ). 48h après l'infection, il s'agit de dénombrer les cellules infectées pour calculer un nombre d'unités infectieuses par millilitre de solution mère adénovirale (IU/mL).

Les cellules infectées avec un adénovirus permettant l'expression de la GFP sont comptées directement grâce à un microscope inversé à fluorescence (Axiovert, Zeiss).

Pour les adénovirus n'exprimant pas la GFP (Ad-SREBP-1a, Ad-SREBP-1c, Ad-BHLHB2 et Ad-BHLHB3), la titration est réalisée grâce au kit QuickTiter Adenovirus Titer Immunoassay commercialisé par Cell Biolabs, Inc (San Diego, CA, USA). Le principe de ce kit repose sur un marquage immunocytochimique des cellules infectées grâce à un anticorps dirigé contre une protéine des hexons constituant l'adénovirus. Cet anticorps reconnaît les 41 sérotypes humains d'adénovirus. Après immunomarquage, les cellules sont comptées sous microscope inversé à lumière blanche.

Le titre d'une solution obtenue par la méthode ci-dessus varie entre  $10^{10}$  et  $5.10^{12}$  IU/mL.

### 2.1.2 Infection de cellules musculaires humaines par adénovirus recombinants

Les cellules musculaires humaines en culture primaire sontensemencées dans des plaques 6 puits recouverts de collagène. Elles sont infectées par adénovirus recombinant, soit sous forme de myoblastes, à 70% de confluence, soit sous forme de myotubes après 4 à 7 jours de différenciation. Chaque puits de culture reçoit  $5.10^7$  UI d'adénovirus. Une infection par un adénovirus surexprimant soit la GFP, soit la Rénilla GFP, est réalisée comme contrôle négatif. Les différentes études sont réalisées après 48h d'infection.

## 2.2. Interférence ARN

Les ARN interférents sont de petits ARNs qui interagissent avec les ARNm pour empêcher la synthèse de la protéine correspondante. Ils sont codés naturellement par le génome des mammifères afin de réguler l'expression d'autres gènes, ils sont alors appelés micro-ARN. Le mécanisme implique deux grandes étapes, les molécules d'ARN sont d'abord transformées en petits fragments d'ARN double brin d'une vingtaine de nucléotides par une enzyme de la famille des RNase III, Dicer, puis l'un de ces brin est incorporé dans un complexe protéique RISC (RNA Induced Silencing Complex) dans lequel il sert de guide pour la reconnaissance des séquences cibles. Si la complémentarité entre le siRNA et l'ARNm cible est parfaite, le complexe RISC clive l'ARNm cible qui est alors dégradé et n'est donc plus traduit en protéine.

L'introduction, dans une cellule, de petits ARNs double brin synthétiques, ou siRNA pour Small Interfering RNA, permet donc de reprogrammer sur une cible choisie par l'expérimentateur une activité nucléase normalement présente dans les cellules. Il est ainsi possible d'inhiber l'expression de n'importe quel gène, du moment que l'on connaît sa séquence.

Cette méthode est ici utilisée pour inhiber l'expression des protéines BHLHB2 et BHLHB3 dans les cellules musculaires humaines en culture primaire.

Des siRNAs dirigés contre les ARNm codant pour BHLHB2 et BHLHB3 ont été synthétisés par la société Qiagen (Courtaboeuf, France). Un siRNA anti-GFP couplé à la rhodamine, molécule fluorescente rouge, également commercialisé par Qiagen, est utilisé comme contrôle.

L'inhibition de l'expression de BHLHB2 et BHLHB3 a pour but de déterminer le lien entre l'effet de SREBP-1 sur les cellules musculaires et l'action de BHLHB2 et BHLHB3.

Des cellules musculaires humaines sont donc, en parallèle, transfectées par les si-RNAs décrits ci-dessus et infectées par les adénovirus recombinants surexprimant SREBP-1a, SREBP-1c ou la GFP. Les cellules musculaires humaines sont ensemencées dans des plaques 6 puits recouverts de collagène I, et traitées sous forme de myoblastes ou de myotubes. Les cellules sont tout d'abord transfectées à l'aide de Hiperfect transfection reagent (Qiagen), mélange de lipides neutres et de lipides cationiques, selon le protocole fourni par le fabricant. Brièvement, une solution de siRNA à 5nM dans du milieu de culture DMEM est incubée en présence de transfectant Hiperfect pendant 10 minutes à température ambiante, afin de permettre la formation de micelles contenant les siRNAs.

Ce mélange est ensuite ajouté au milieu de culture des cellules. Les cellules sont mises à incuber à 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. 24h plus tard, le milieu de culture des cellules est changé et l'infection par les adénovirus recombinants est réalisée comme indiqué ci-avant. L'efficacité de transfection peut-être évaluée par observation sous microscope à fluorescence des cellules transfectées avec le si-RNA anti-GFP couplé à la rhodamine, fluorochrome rouge. La proportion de cellules contenant le siRNA est d'environ 70% à 80%. Le degré d'inhibition de l'expression de BHLHB2 et BHLHB3 est déterminé par dosage des ARNm par PCR quantitative.

### **3. Surexpression de protéines *In vivo* dans le muscle de souris**

Le développement de techniques efficaces permettant la manipulation du génome du muscle squelettique *in vivo* est essentiel pour une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires dirigeant le maintien de la fonction musculaire. La recherche dans ce domaine est très intense, portée par l'espoir de possibles thérapies géniques pour corriger myopathies et dystrophies.

Nombreuses sont les méthodes proposées permettant l'insertion de gène exogène dans le muscle. Ces méthodes, testées pour la plupart chez le rongeur, sont basées principalement sur l'injection intramusculaire directe de vecteurs d'expression viraux ou non-viraux. Les plasmides furent les premiers vecteurs utilisés pour leur facilité de manipulation, mais leur capacité de transfection des fibres musculaires était bien trop faible, et l'expression du

transgène était très hétérogène au sein du muscle. Parmi les vecteurs viraux les plus couramment utilisés, le Herpes Virus Simplex de type 1 permet une infection très efficace des myoblastes et myotubes *in vitro* mais montre une très faible efficacité d'infection *in vivo*. Les rétrovirus infectent très bien les myoblastes en prolifération mais échouent à infecter les fibres musculaires post-mitotiques. Les « adeno-associated virus », virus naturellement déficient pour l'autoréplication, infectent aussi bien les cellules en prolifération que les cellules post-mitotiques avec une très faible cytotoxicité, mais ce type de virus s'intégrant au génome de leur hôte, leur utilisation est fortement liée à un risque d'insertion mutagène.

Les adénovirus recombinants semblent être les meilleurs candidats pour le transfert intramusculaire de gène *in vivo*. Les adénovirus infectent efficacement les myoblastes prolifératifs comme les fibres musculaires post-mitotiques, ne s'intègrent pas au génome de l'hôte et ne sont donc pas mutagènes. De plus, ils permettent le transfert de gros inserts génomiques.

Parmi les différentes stratégies présentées, nous avons retenu celle de Mohan K. Sapru *et al.* publiée en 2002 (Sapru *et al.* 2002). Cette technique consiste en une injection unique d'adénovirus recombinant, porteur d'un insert sous contrôle d'un promoteur viral fort, directement dans le muscle d'un rat. Le titre infectieux de l'injection doit être élevé afin de compenser l'hétérogénéité d'infectibilité des fibres lentes par rapport aux fibres rapides au sein d'un même muscle. Ainsi, les auteurs rapportent un taux d'infection de 80% de fibres musculaires dans le Tibialis Antérieur de rat.

Dans notre étude, nous avons donc appliqué cette technique, telle que décrite par les auteurs, chez la souris.

### **3.1. Les animaux**

Les animaux utilisés pour cette étude sont des souris mâle BALB/c de 12 à 14 semaines obtenues chez Harlan (Gannat, France). L'âge des souris utilisées a été fixé en fonction de leur courbe de croissance théorique, dans le but de limiter l'interférence de la croissance musculaire avec l'expérience. A partir de 12 semaines, la croissance des BALB/c atteint un plateau, la formation des fibres musculaires matures est donc théoriquement achevée.

Les souris sont hébergées en cages collectives durant une semaine pour acclimatation, puis transférées en cage individuelle pour la durée du protocole. Elles ont accès à l'eau et à une nourriture commerciale standard *ad libitum*.

Toutes les procédures réalisées sur les animaux le sont en accord avec la législation française pour l'utilisation d'animaux dans la recherche en laboratoire publique, et selon le guide pour les soins et l'utilisation des animaux de laboratoire.

### **3.2. Injection adénovirale intramusculaire**

Avant de subir l'injection, les animaux sont anesthésiés à l'aide de sodium penthobarbital à raison de 50mg/kg, injecté en intrapéritonéal. La zone d'injection sur les pattes postérieures des animaux est rasée.

Une suspension de 10 $\mu$ L d'adénovirus diluée dans du sérum physiologique correspondant à 1.10<sup>10</sup> unités infectieuses, est injectée en une seule fois directement dans le Tibialis antérieur. Le Tibialis antérieur droit de chaque animaux reçoit une injection d'adénovirus codant à la fois soit pour SREBP-1a soit pour SREBP-1c et la protéine fluorescente GFP, construits comme indiqué §2. Le Tibialis contra-latéral reçoit une injection d'adénovirus codant uniquement pour la GFP, comme contrôle.

Sept jours après l'injection adénovirale, les animaux sont à nouveau anesthésiés. Le Tibialis antérieur de chaque patte est prélevé par dissection, immédiatement plongé dans l'azote liquide puis inclus dans une résine protectrice (*Tissue Tech*).

### **3.3. Traitement des tissus**

A partir des tissus ainsi prélevés, des coupes congelées de 10  $\mu$ m sont réalisées à l'aide d'un Cryostat. Une coupe sur 10 est montée sur lame polylysine. Les lames sont stockées à -80°C.

Pour être traitées, les coupes sont décongelées pendant 30 minutes à température ambiante. Les tissus sont fixés dans l'acétone refroidi à -20°C pendant 10 minute, puis séchés sous hotte pendant 30 minutes. Les coupes subissent ensuite 3 lavages de 10 minutes dans du tampon Phosphate PBS 1X.

Les noyaux cellulaires des tissus sont marqués au DAPI, fluorochrome se liant à l'ADN. Pour cela les coupes sont plongées pendant 3 minutes dans un bain de DAPI dilué 5000 fois. Puis rincées 3 fois 15 minutes dans du PBS.

Les coupes sont ensuite montées entre lame et lamelle dans du milieu Fluoprep Vectashield Hard-Set (H1400, Vector Laboratories, Peterborough, England) et conservées à 4°C.

### **3.4. Observation et analyse**

Les coupes sont observées sous microscope à fluorescence Axiovert 200 couplé à une caméra Axioacam MRm (Zeiss, Göttingen, Allemagne). Grâce au logiciel d'acquisition d'image Axiovision 4.1., des photos représentatives de quatre zones réparties dans chaque muscle sont prises. La fluorescence naturelle de la GFP permet de visualiser les fibres musculaires infectées soit par l'adénovirus codant uniquement pour la GFP, soit par les adénovirus codant à la fois pour SREBP-1a ou SREBP-1c et la GFP. L'intensité de fluorescence de chaque fibre dépend de son niveau d'infection et est le reflet de la surexpression de SREBP-1.

La taille de chaque fibre musculaire ainsi que son intensité de fluorescence sont déterminées grâce au logiciel de traitement d'image ImageJ distribué par le NIH (National Institute of Health, USA). La taille réelle est obtenue par conversion des pixels en  $\mu\text{m}$ , le coefficient de conversion étant le suivant :

- à objectif x 100 :  $1\text{px}=0,64 \mu\text{m}$
- à objectif x 200 :  $1\text{px}= 0,32 \mu\text{m}$

Pour chaque muscle pris en compte dans l'étude, 200 à 400 fibres sont mesurées.

## **4. Etudes transcriptomiques**

Le transcriptome est l'ensemble des ARN messagers, ou transcrits, exprimés dans une cellule d'un tissu donné, à un moment donné, dans des conditions données. C'est le reflet instantané de l'activité cellulaire.

Le terme générique « omics » fait référence à de nouvelles disciplines scientifiques (génomique, transcriptomique, protéomique, métabolomique,...) dont le but est l'analyse des interactions entre divers constituants biologiques (gènes, transcrits, protéines, métabolites,..) . Ces disciplines mettent en œuvre des technologies dites à haut débit, permettant la génération et l'analyse d'un très grand nombre de données.

Parmi ces disciplines, la transcriptomique est l'analyse simultanée de la totalité des transcrits d'un échantillon, permettant de mettre en exergue des réseaux d'interactions géniques.

Les puces à ADN sont le principal outil de la transcriptomique.

#### **4.1. Les puces à ADN**

Cette technologie repose sur le même principe d'hybridation de séquences nucléotidiques complémentaires que les techniques de *Southern* et *Northern* Blot, utilisées pour détecter et quantifier la présence d'une séquence ADN ou ARN spécifique au sein d'un échantillon. La conception de puces à ADN a permis d'étendre ce principe à la détection simultanée d'un très grand nombre de séquences nucléotidiques.

Une puce à ADN est constituée d'un support solide sur lequel sont immobilisés des milliers de fragments d'ADN, des sondes dont la séquence est spécifique d'autant de gènes. Mis au contact de l'ensemble des transcrits issus d'un échantillon, ces sondes vont s'hybrider avec leurs cibles spécifiques, préalablement marquées par un fluorochrome. La mesure de l'intensité de fluorescence pour chaque hybride sonde/cible permet la détection et la quantification du niveau d'expression d'un transcrit dans l'échantillon. Les cibles de deux échantillons à comparer sont marquées au moyen de fluorochromes différents, mélangées et hybridées sur une même puce. L'intensité des signaux relatifs à chaque fluorochrome permet d'évaluer l'expression différentielle de gènes entre les deux conditions (Figure 55).

Pratiquement, l'analyse d'un transcriptome sur puces ADN se déroule en plusieurs étapes :

- définition du protocole expérimentale
- la préparation des cibles
- l'hybridation
- la lecture du signal
- l'analyse des données obtenues

##### **4.1.1. Définition du protocole expérimentale**

Etant donnée la lourdeur expérimentale d'un tel protocole, le choix du plan expérimental est l'étape cruciale pour obtenir des données d'expression pertinentes.

Selon la finalité du protocole, deux approches sont envisageable pour obtenir des données d'expression :

- l'hybridation sur puces ADN pangénomiques, pour analyser rapidement et de façon exhaustive les transcrits présent à l'échelle du génome entier
- l'hybridation sur puces ADN dédiées, constituées par une collection de gènes liés à un tissu, une pathologie ou une thématique.

Ce choix est bien-sûr dicter par l'hypothèse que l'on veut vérifier.

Le but de notre travail était de déterminer la totalité des gènes régulés dans le muscle squelettique humain, d'abord par les facteurs de transcription SREBP-1a et SREBP-1c, puis par les répresseurs transcriptionnels BHLHB2 et BHLHB3. Nous avons donc réalisé l'analyse du transcriptome de cellules musculaires humaines surexprimant SREBP-1a, SREBP-1c, BHLHB2 ou BHLHB3 sur puces ADN pangénomiques. Les puces à ADN utilisées pour cette étude sont les puces oligonucléotidiques pangénomiques humaines du Réseau National des Genopôles (RNG). Ces puces sont constituées de 25 342 sondes de 50 à 52 mers permettant la reconnaissance de plus de 20 000 transcrits humains.

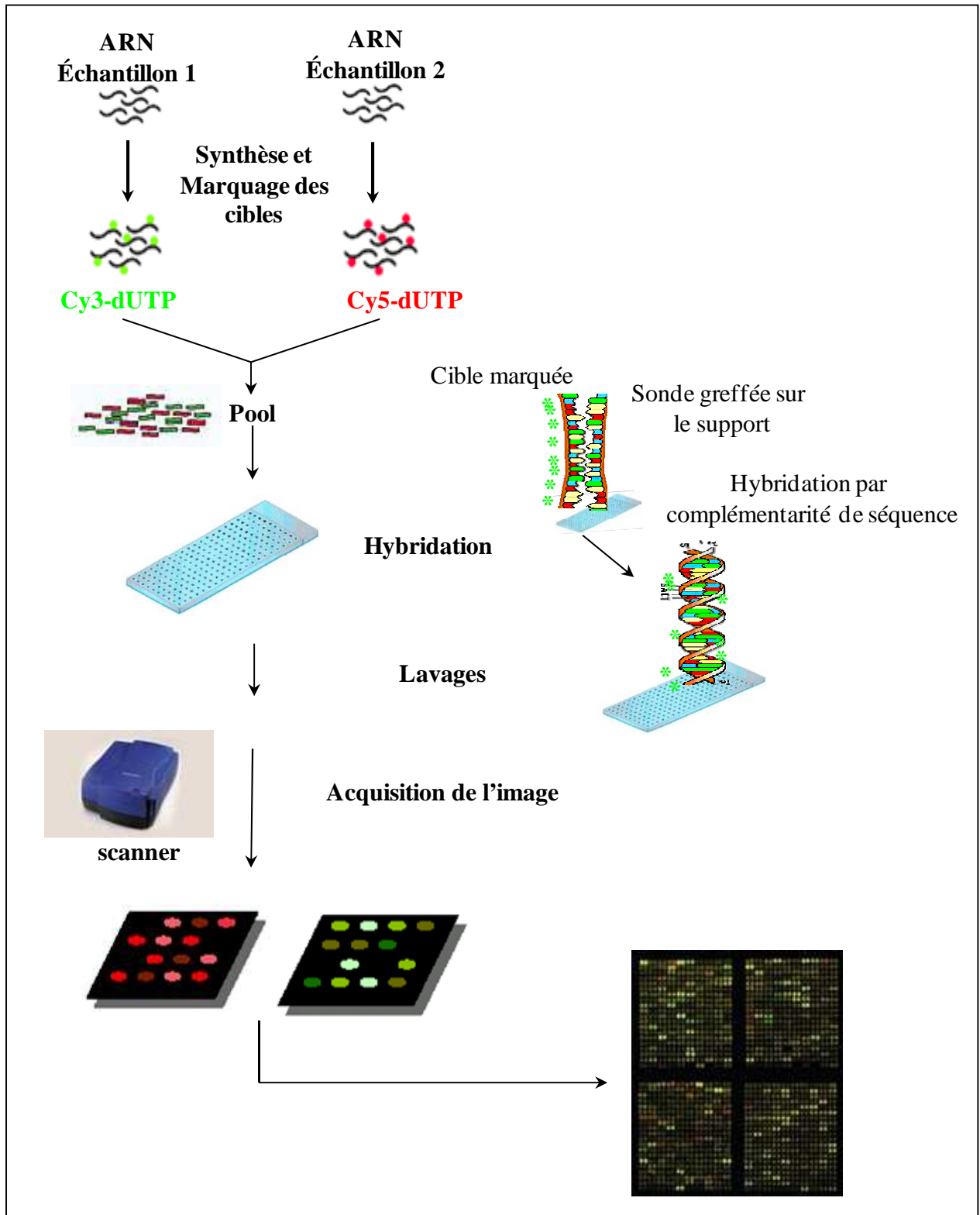
La détermination des gènes différentiellement exprimés entre deux échantillons peut se faire de deux façons :

- par comparaison directe : les deux échantillons, traité et contrôle, sont hybridés sur une même lame
- par comparaison indirecte : les deux échantillons sont hybridés sur deux lames différentes contre un échantillon de référence

Afin de s'affranchir de l'effet propre de l'infection par un adénovirus sur l'expression génique des cellules, l'analyse de chaque échantillon traité par les adénovirus surexprimant une des protéines d'intérêt a été réalisée en comparaison directe, contre un échantillon contrôle des mêmes cellules, infectées par un adénovirus codant soit pour la Rénilla (contre les échantillons SREBP-1a et SREBP-1c) soit pour la GFP (contre les échantillons BHLHB2 et BHLHB3).

L'étude est réalisée sur des myotubes humains en culture primaires issus de biopsies de trois sujets différents.





**Figure 55** : Principe de l'analyse des variations d'expression génique par puces à ADN.

## 4.1.2. Préparation des échantillons-cibles

### a) Extraction des ARN totaux

L'extraction des ARN totaux à partir des cellules musculaires humaines est réalisée selon une adaptation du protocole de Chomczynski et Sacchi (1987). Les cellules sont lysées dans du TRIzol<sup>®</sup> reagent (Invitrogen life technology), les ARN sont extraits à l'aide de phénol-chloroforme, précipité à l'isopropanol et repris dans 40µL d'eau exempte de RNase.

La quantification des ARN totaux est réalisée en spectrophotométrie par mesure de l'absorbance à 260nm. L'absence de contamination par des protéines est vérifiée en mesurant l'absorbance à 280nm. L'intégrité des ARN est déterminée à l'aide du Bioanalyser 2100 et de la puce RNA LabChip 6000 de chez Agilent Technologies (Massy, France).

### b) Amplification des ARNm

La technologie des puces à ADN nécessite l'hybridation d'une quantité importante d'ARN total (5 à 20 µg) peu compatible avec le rendement d'extraction à partir de culture primaire de cellules humaines. Pour palier à cette limitation, une étape d'amplification des ARNm est donc nécessaire. Trois étapes successives la composent : une étape de transcription inverse pour générer les ADNc, suivie d'une seconde étape de synthèse du second brin d'ADN. Les ADN double-brin sont ensuite transcrits *in vitro* en ARN antisens. Le kit Aminoallyl MessageAmp aRNA kit d'Ambion (Austin, TX, USA) permet de générer des ARN antisens aminoallylés.

### c) Marquage des ARNa-cibles

La méthode de marquage enzymatique dite indirecte nécessite d'abord l'incorporation de nucléotides modifiés aminoallylés, réalisée lors de l'étape d'amplification, puis le couplage chimique des molécules fluorescentes aux nucléotides modifiés.

Les fluorochromes utilisés sont la Cyanine3, émettant une lumière verte, et la Cyanine5, émettant une lumière rouge. 5 µg d'ARNa sont couplés chimiquement à ces marqueurs en présence de sodium bicarbonate 0,1M pH9 et de DMSO. La réaction est stoppée avec de l'Hydroxylamine 4M et les ARNa ainsi marqués sont purifiés avec le kit Rneasy mini (Qiagen).

Le dosage par spectrométrie de masse aux longueurs d'ondes 260, 550 et 650nm permet de calculer le rendement de marquage des acides nucléiques.

#### **4.1.3. Hybridation**

Avant l'hybridation à proprement parler, les puces à ADN doivent subir une pré-hybridation pour bloquer les sites de fixation aspécifiques sur la lame. Les puces RNG sont préhybridées dans un tampon Ethanolamine 50mM, Sodium Borate 50mM à température ambiante pendant 60 minutes.

Au préalable à toute hybridation, les cibles marquées sont fragmentées pour faciliter leur hybridation avec les sondes complémentaires. La fragmentation est réalisée à 60°C pendant 30 minutes dans le tampon de fragmentation 25 X Agilent.

Les cibles marquées fragmentées sont ensuite hybridées sur puce RNG en présence de tampon d'hybridation 2X Agilent, en chambre Agilent, dans un four à hybridation rotatif Agilent pendant 16h à 62°C.

Deux échantillons cibles marqués, l'un par Cy3, l'autre par Cy5, sont hybridés simultanément sur une même puce RNG : un échantillon issu de myotubes surexprimant SREBP-1a, SREBP-1c, BHLHB2 ou BHLHB3 et un échantillon contrôle issu de myotubes surexprimant la Rénilla ou la GFP.

#### **4.1.4. Acquisition de l'image de la puce à ADN**

Le procédé de détection classiquement utilisé pour les marquages fluorescents repose sur un laser qui excite les fluorochromes à 2 longueurs, 635nm pour les Cy5 et 532nm pour le Cy3, et un microscope confocal couplé à un photomultiplicateur pour analyser les photons émis par les fluorochromes.

Les puces RNG sont scannées avec le scanner GenePix<sup>®</sup> 4000B (Molecular Devices, Union City, CA, USA). Pour chaque lame, la puissance des photomultiplicateurs est ajustée afin d'obtenir des signaux en rouge et en vert équivalents.

#### 4.1.5. Analyse des données

Les images obtenues sont analysées grâce aux logiciels GenePix<sup>®</sup> Pro 4 (Molecular Devices).

La première partie de l'analyse consiste à assigner des coordonnées à chaque spot afin de le localiser (gridding) et de délimiter la surface du spot par rapport au reste de la lame (segmentation). Le logiciel génère ensuite des données numériques caractérisant le signal et le bruit de fond associés à chaque spot. Ces valeurs sont utilisées pour le calcul de variation d'expression pour chaque sonde.

Le niveau d'expression relatif à chaque gène est estimé par la valeur du ratio d'expression calculé à partir des intensités des signaux en rouge et en vert :

$$R_{r/v}(i) = \frac{\text{Intensité médiane du spot}(i) \text{ en rouge} - \text{médiane du bruit de fond local en rouge}}{\text{Intensité médiane du spot}(i) \text{ en vert} - \text{médiane du bruit de fond local en vert}}$$

Pour manipuler et analyser les données, les ratios d'expression sont usuellement transformés en logarithme de base 2.

Les données sont ensuite normalisées par la méthode de Lowess (Locally weighted scatter plot smoothing), permettant de prendre en compte la non linéarité de la relation entre le signal rouge et le signal vert. Une normalisation inter-lame globale est réalisée grâce au logiciel Cluster 3.0.

Pour détecter les gènes dont les niveaux d'expression sont statistiquement différents entre les deux conditions expérimentales testées, le test SAM (Significance Analysis of Microarray) est appliqué, avec comme seuil de sélection, un taux d'erreur médian associé ou FDR (False Discovery Rate) à 5%. Seuls les spots présentant des variations supérieures ou égales à 1,3 sont considérés comme différentiellement régulés.

Enfin, l'homogénéité de réponse entre les différentes sondes présentes sur la puce et codant pour un même gène est vérifiée par un test de Student.

#### 4.2. Interprétation Biologiques des Données de Puces ADN

L'analyse de puce à ADN pangénomique résulte en une liste de plusieurs centaines de gènes régulés. Ces données nécessitent d'être restituées dans leur contexte biologique pour être interprétées. L'intégration des métadonnées c'est-à-dire l'ajout d'informations complémentaires issues de différentes sources, est donc indispensable pour l'interprétation

des données issues de l'analyse du transcriptome. Ces métadonnées sont généralement disponibles sous la forme de bases de données publiques.

La base de données SOURCE (<http://source.stanford.edu/>) permet d'extraire, à partir d'une liste de symboles ou d'identifiants de gènes, un très grand nombre d'informations telles que les différents identifiants associés au gène, la localisation chromosomique, la localisation subcellulaire de la protéine associée, une description fonctionnelle, les annotations Gene Ontology qui lui sont relatifs. De plus, SOURCE fournit de nombreux liens vers des bases de données externes : Unigene, OMIM, Genecard.

Les logiciels d'analyse de fonctions ontologiques en ligne, GOSTat (<http://gostat.wehi.edu.au>) et FatiGO+ (<http://babelomics2.bioinfo.cipf.es/fatigoplus/cgi-bin/fatigoplus.cgi>), nous ont permis de classer les gènes régulés, au cours d'une surexpression de SREBP-1a/1c ou BHLHB2/B3, en plusieurs catégories fonctionnelles et d'identifier ainsi les principales fonctions biologiques affectées par ses protéines. Ces outils permettent de soumettre une liste de gènes sur laquelle on recherche une surreprésentation de certaines catégories fonctionnelles ou annotations grâce à un test de Fisher.

Grâce à l'outil en ligne TRASER., lié à la base de données du NCBI, les séquences promotrices des gènes significativement régulés ont été extraites sur 1000 paires de bases en amont de site d'initiation de la transcription. Afin d'identifier des sites putatifs de fixation de facteurs de transcription connus, ces séquences ont été analysées à l'aide de l'outil MatInspector de la suite Genomatix (<http://www.genomatix.de>). MatInspector réalise une analyse statistique pour évaluer la représentativité de ces sites de fixation dans notre jeu de donnée et déterminer si certains facteurs de transcription sont significativement plus présents sur les promoteurs des gènes étudiés.

## **5. Mesure de l'expression Génique**

### **5.1. Préparation des ARN**

#### **5.1.1. Extraction**

L'extraction des ARN totaux à partir de cellules musculaires humaines en culture primaire ou à partir de tissus musculaires murins est réalisée à l'aide de TRIzol<sup>®</sup> reagent (Invitrogen), selon les recommandations du fournisseur.

Les ARN sont ensuite dosés par spectrophotométrie à 260nm.

### **5.1.2. Reverse transcription**

La RT est réalisée sur 1µg d'ARN totaux, de manière non spécifique, en présence de SuperScript II<sup>®</sup> RNase H- Reverse Transcriptase (Invitrogen), d'un mélange d'oligodT et d'hexamères oligonucléotidiques non spécifiques.

### **5.2. Dosage des ARNm cibles**

Les ARN messagers sont quantifiés par PCR quantitative en temps réel, en utilisant des amorces spécifiques des ADNc étudiés.

La PCR quantitative est réalisée sur 5µL du produit de RT dilué au 1/60<sup>ème</sup> mélangé à 15 µL de milieu réactionnel ABsolute™ QPCR SYBR<sup>®</sup> Green Mix (ABgene, Courtaboeuf, France), à l'aide d'un Rotor-Gene 6000™ (Corbett Research, Mortlake, Australia).

## **6. Mesure de l'expression protéique**

### **6.1. Quantification des protéines par Western-Blot**

#### **6.1.1. Préparation des extraits protéiques**

Les cellules sont directement lysées à 4°C, dans un tampon de lyse de composition suivante : TRIS 20mM ; NaCl 138mM ; KCl 2,7mM ; MgCl<sub>2</sub> 1mM ; Glycérol 5% ; NP 40 1% ; EDTA 5mM ; Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 1mM ; NaF 20mM ; DTT 1mM, auquel est ajouté un cocktail d'inhibiteurs de protéases (Sigma Aldrich, St-Quentin-Fallavier, France).

Les tissus musculaires prélevés sur les souris sont d'abord réduits en poudre au froid, avant d'être repris dans ce même tampon de lyse à raison d'1 µL de tampon par µg de poudre.

Les protéines sont quantifiées par la méthode de Bradford, à l'aide du kit BioRad Protein Assay (Bio-Rad laboratory, Marne-la-Coquette, France).

### **6.1.2. Western Blot**

Les échantillons protéiques sont dénaturés à 100°C pendant 5 minutes en présence de tampon Laemli 1X : Tris-HCL 50 mM, Glycérol 12%, SDS 1%,  $\beta$ mercaptoéthanol 4%, Bleu de BromoPhénol 0,01%, pH 6,8.

Les protéines sont ensuite séparées selon leur masse moléculaire sur un gel d'acrylamide-bis-acrylamide de type SDS-PAGE puis transférées sur membrane PVDF (Fluorure de polyvinylidène) 0,2 $\mu$ m ou 0,4 $\mu$ m selon la taille de la protéine d'intérêt.

Les protéines persistantes sur le gel sont colorées au bleu de Coomassie.

La membrane est incubée une nuit à 4°C en présence de l'anticorps primaire dirigé contre la protéine d'intérêt, puis en présence d'un anticorps secondaire couplé à la Horseradish Peroxidase pendant 1h à température ambiante.

La présence de protéines est révélée par chimioluminescence liée à l'activité Peroxydase grâce au kit Enhanced Chemiluminescence System (Pierce, Rockford, IL, USA). Le signal est détecté par autoradiographie et quantifié grâce au logiciel Image J distribué par le NIH. La quantité de protéine totale est normalisée par rapport à l'intensité de la coloration au bleu de Coomassie du gel de migration.

### **6.2. Détection des protéines par immunofluorescence**

Les cellules sont fixées par incubation dans une solution de 10% de formaldéhyde dans du Tampon Phosphate PBS 1X (Invitrogen), pendant 10 minutes à température ambiante. La réaction est arrêtée par une solution de Glycine 100 mM dans du PBS 1X. La perméabilisation est réalisée grâce à 0,1% de Triton X100 dilué dans du PBS. Afin de bloquer les sites de fixation antigéniques non spécifiques, les cellules sont incubées avec 1% de Bovine Serum Albumine (BSA, Sigma Aldrich) dans du PBS, pendant 1h à température ambiante. Elles sont ensuite mises en présence de l'anticorps primaire anti-myogénine (F5D; Developmental Studies Hybridoma Bank, University of Iowa, Iowa City, IA) ou anti-troponine (C-19; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) dilué au 1/50<sup>ème</sup> dans du PBS-1%BSA, une nuit durant, à 4°C.

La présence de la protéine d'intérêt est révélée par un anticorps secondaire couplé à un fluorochrome, l'Alexa Fluor 555, émettant une lumière rouge (Molecular Probes, Invitrogen).

Les cellules immunomarquées sont photographiées à l'aide d'un microscope à fluorescence couplé à une caméra. Le signal fluorescent est quantifié grâce au logiciel Image J distribué par le NIH (Carl Zeiss, Göttingen, Germany).

## **7. Etude de Promoteurs**

### **7.1. Recherche de sites de fixation de facteurs de transcription**

De nombreux outils disponibles en ligne permettent la recherche de sites putatifs de fixation de facteurs de transcription. Ces outils utilisent de large banque de données de matrice définies à partir de motif consensus de reconnaissance de facteur de transcription, et recherchent l'occurrence de ces matrices sur les séquences promotrices à analyser.

Afin de détecter la présence de motif de liaison à SREBP sur les promoteurs des gènes codant pour BHLHB2 et BHLHB3, nous avons utilisé 3 outils : TFsearch (<http://molsun1.cbrc.aist.go.jp/research/db/TFSEARCH.html>), et AliBaba2.1 ([http://darwin.nmsu.edu/~molb470/fall2003/Projects/solorz/aliBaba\\_2\\_1.htm](http://darwin.nmsu.edu/~molb470/fall2003/Projects/solorz/aliBaba_2_1.htm)), utilisant tout deux la base de données de matrices de fixation de facteurs de transcription TRANSFAC, et l'outil MatInspector de la suite Genomatix (<http://www.genomatix.de>). La matrice utilisée par MatInspector pour la reconnaissance des sites de fixation de SREBP est : [TCACnnCA].

### **7.2. Immunoprécipitation de Chromatine (ChIP)**

La technique de ChIP permet de mettre en évidence une interaction protéine/ADN, comme celle d'un facteur de transcription sur son site de liaison à un promoteur. L'interaction protéine/ADN est fixée par l'utilisation de formaldéhyde. La chromatine, à laquelle sont liées les protéines, est fragmentée puis immunoprécipitée à l'aide d'un anticorps spécifique du facteur de transcription dont on veut vérifier le site de fixation. L'interaction entre ce facteur de transcription et la région promotrice d'intérêt est mesurée par PCR.

La préparation de la chromatine et son immunoprécipitation ont été réalisées grâce au kit ChIP-IT™ Express (Active Motif, Rixensart, Belgique), selon les recommandations du fournisseur.



### **7.2.1. Fixation et fragmentation de la chromatine**

10 flasques F75 de cellules HEK293 à confluence sont fixées par une solution de Formaldéhyde 1% dans du milieu de culture DMEM, sous agitation lente, pendant 10 minutes à température ambiante. La réaction de fixation est stoppée par ajout de Glycine 1M pH8. Après 5 minutes d'incubation, les cellules sont rincées à l'aide de PBS froid puis trypsinées, grattées et centrifugées à 4°C, 10 minutes, à 2500 rpm.

Le culot cellulaire est repris dans un tampon de lyse froid contenant un cocktail d'inhibiteurs de protéases et du PMSF, et incubée sur glace. Les cellules sont ensuite cassées dans un Potter en verre fritté. La suspension cellulaire est centrifugée à 4°C, 10 minutes à 5000 rpm.

La chromatine est ici fragmentée par méthode enzymatique. Cette méthode repose sur les propriétés de la nucléase micrococcale, une endo-exonucléase qui clive les brins d'acides nucléiques.

Le culot de noyaux cellulaires est repris dans un tampon de digestion auquel est ajouté un cocktail enzymatique Enzymatic Shearing Cocktail (Active Motif). Ce mélange est incubé 7 minutes à 37°C. La réaction de digestion est stoppée par ajout d'EDTA froid et incubation 10 minutes sur glace. Le produit de digestion est centrifugé à 4°C, 10 minutes à 15000 rpm ; le surnageant contenant la chromatine fragmentée est collecté. Cette digestion enzymatique permet d'obtenir des fragments de chromatine de 200 à 1000 paires de bases.

Afin de quantifier l'ADN présent dans l'échantillon et d'en vérifier la fragmentation, un aliquote de chromatine fragmentée est incubé 15 minute à 95°C pour reverser la fixation des protéines sur la chromatine (étape de « reverse cross-linking »), puis traité successivement à la RNase A puis à la Protéinase K. L'ADN est ensuite purifié par une extraction au phénol/chloroforme. L'ADN est quantifié par spectrophotométrie à 260 nm. La fragmentation de la chromatine est vérifiée par migration sur gel d'agarose 1%.

### **7.2.2. Immunoprécipitation de la chromatine**

Lors de cette étape, la chromatine fragmentée est mis en contact d'anticorps spécifiques qui vont lier les protéines d'intérêt, ici SREBP-1, qui y sont fixées. Les immuno-complexes chromatine/protéine/anticorps sont ensuite précipités à l'aide billes magnétiques

couplées à la protéine G, ayant la capacité de lier les immunoglobulines G (IgG). Les immuno-complexes et les protéines libres fixées à la chromatine sont ensuite éliminés au cours d'une réaction dite de « reverse cross-linking » et d'un traitement à la Protéinase K.

Les immunoprécipitations sont réalisées sur 20 µg de chromatine fragmentée. Les échantillons de chromatine sont incubés à 4°C, sur la nuit, dans un agitateur rotatif, en présence de billes magnétiques couplées à la protéine G et de 7µg de l'anticorps anti-SREBP-1 (H160, Santa Cruz Biotechnology), ou d'IgG de lapin, comme contrôle de liaison aspécifique. Un échantillon de chromatine est incubé dans les mêmes conditions mais sans anticorps pour servir de contrôle négatif ou condition Mock. Enfin, un aliquote de chromatine fragmentée ne subissant pas l'immunoprécipitation est conservé et servira de contrôle positif ou Input.

Les billes magnétiques liées aux immuno-complexes sont précipitées à l'aide d'un aimant et rincées plusieurs fois afin d'éliminer les interactions non spécifiques. Les billes sont ensuite reprises dans 50 µL d'un tampon d'élution et incubées 15 minutes à température ambiante dans un agitateur rotatif. A l'issue de cette incubation, 50 µL de tampon de « reverse cross-linking » sont ajoutés, les billes sont précipitées et le surnageant, contenant la chromatine libérée, est collecté. Cette chromatine, ainsi que celle de l'Input, est ensuite incubée 15 minutes à 95°C puis traitée à la protéinase K.

Après purification sur colonnes du kit MinElute™ de Qiagen, les échantillons sont prêts pour réaliser les PCR.

### **7.2.3. Révélation par PCR**

La fixation de SREBP-1 sur les promoteurs de BHLHB2 et BHLHB3 est révélée à la fois par PCR classique et par PCR quantitative.

Les amorces choisies pour ces PCR sont spécifiques des régions promotrices dans lesquelles ont été mis en évidence des motifs de liaison à SREBP.

Pour déterminer la fixation de SREBP-1 sur le promoteur de BHLHB2, les amorces choisies sont :

- 5'-GGCAGGTCGCTCCTTCCCTC-3' comme amorce sens
- 5'-CTGCGGGCTGGGTAAATGG-3' comme amorce antisens

Pour déterminer la fixation de SREBP-1 sur le promoteur de BHLHB3, les amorces choisies sont :

- 5'-TCAGAACGCGGCAGAGTTGAGC-3' comme amorce sens
- 5'-CTGGGCCAACTAAACTTCCC-3' comme amorce antisens, pour le premier SRE putatif
- 5'-TACGTTCCGCACGTGAGCTG-3' comme amorce sens
- 5'-CCACTGCGCTGGTAGTTTGC-3' comme amorce antisens, pour le second SRE putatif

Enfin, comme contrôle négatif, des amorces ont été choisies dans une région génomique non codante éloignée des séquences cibles en + 35 000 du site d'initiation de transcription de BHLHB2 :

- 5'-AGCACTGCCTGCAGGCTCAA-3' comme amorce sens
- 5'-GTCTAGGAGTGAGGATGCAT-3' comme amorce antisens

Les PCR classiques sont réalisées sur 5 µL d'échantillon de toutes les conditions de ChIP, à l'aide du kit GoTaq® Green Master Mix (Promega).

Les PCR quantitatives sont réalisées sur 5 µL d'échantillon de toutes les conditions de ChIP, mélangés à 15 µL de milieu réactionnel ABsolute™ QPCR SYBR® Green Mix (ABgene), à l'aide d'un Rotor-Gene 6000™ (Corbett Research).

### **7.3. Mesure de l'activité promotrice par système gène rapporteur**

Un gène rapporteur ou gène marqueur est un gène codant pour une protéine dont l'activité est bien caractérisée et facilement détectable. Ce gène est ajouté à une construction génomique afin d'en révéler les modifications. Dans le cadre d'une étude de l'activité promotrice d'un gène, une portion du promoteur de ce gène est clonée en amont du gène rapporteur. L'activité de la protéine codée par le gène rapporteur est donc directement proportionnelle à l'activité promotrice du gène d'intérêt.

Dans notre étude, les promoteurs des gènes BHLHB2 et BHLHB3 sont clonés en amont du gène de la luciférase. La luciférase de type Firefly est exprimée par la luciole *Photinus pyralis* et catalyse l'oxydation de la luciférine en produisant de la lumière, dont l'intensité peut-être mesurée.

### 7.3.1. Clonage des promoteurs BHLHB2 et BHLHB3

Nous avons obtenu du Pr Eugène R. Zabarovsky (Microbiology and Tumour Biology Center and Center for Genomics and Bioinformatics, Karolinska Institute, Stockholm, Suède) un clone génomique (NR5-IH18RS) contenant un fragment du promoteur humain de BHLHB2, correspondant à la région proximale -408/+75. Le fragment correspondant à la région distale -951/-407 a été généré par PCR à partir d'ADN génomique humain en utilisant les amorces suivantes :

BHLHB2 -951/-407 sens (BHLHB2-p-Sac1) : 5'-GCCCGCCCGCAGGTTGTGCC-3';

BHLHB2 -951/-407 antisens (BHLHB2-p-Not1): 5'-AGGTGTCTGCGGCTGCGGCCG-3'.

Le fragment -951/-407, ainsi obtenu, a été cloné dans le plasmide pGEM-T easy (Promega). Le fragment proximal du promoteur BHLHB2-408/+75 a été d'abord sous-cloné dans le plasmide pBluescript KS+ (Stratagene, La Jolla, France), formant le plasmide PBS-B2. Puis dans le plasmide rapporteur pGL3-Enhancer (Promega), en amont du gène de la luciférase, formant ainsi le plasmide rapporteur pB21. Le plasmide pB22 est obtenu par clonage du fragment distal -951/-407 en amont du fragment proximal dans pB21.

Les plasmides pB23 (-264/+75) et pB24 (-6/+75) ont été obtenus par délétion de pB21 par digestion enzymatique.

Les clones pB25 à pB28, chacun contenant une région promotrice de BHLHB2 de plus en plus restreinte, ont été obtenus par PCR réalisée à partir de pBS-B2 en utilisant les amorces suivantes :

pB25 (-357/+75) sens : 5'-ATGAGCTCGCGTTGTCCAACACGTGAGACT-3';

pB26 (-187/+75) sens : 5'-ATGAGCTCTCTCCATTACTCCTCGGCTT-3';

pB27 (-105/+75) sens : 5'-ATGAGCTCCGCCCGCCCCACTTCTCATT-3';

pB28 (-77/+75) sens : 5'-ATGAGCTCGCTCGCACGGCGCAGACAGA-3';

T3 primer PBS-KS + antisens : 5'-AATTAACCCTCACTAAAGGG-3'.

Pour cloner le promoteur humain de BHLHB3, deux ADN complémentaires des régions -940/-289 and -524/+238 ont été générés par PCR à partir d'ADN génomique humain grâce aux amorces suivantes :

BHLHB3 -940/-289 sens (P1): 5'-AGGATCCGAGGTGCCAGCGGTAGTAAACG-3';

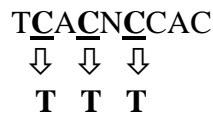
BHLHB3 -940/-289 antisens (P3): 5'-GACTCCCTGGGTTCGTCCGTTG-3';

BHLHB3 -524/+238 sens (P2): 5'-TTCAAGGAGCGGATTGCAAG-3';

BHLHB3 -524/+238 antisens (P4):5'-TAGATCTCTGTGGGACGGTAGGCTTGG-3'.

Ces fragments ont été ensuite sous-clonés dans le pGEM-T Easy puis dans le pGL3-E en amont du gène de la luciférase, pour former le plasmide pB32.

Les plasmides pB21mut1, pB32mut1-mut2-mut1/2, contenant les sites SRE mutés, ont été obtenus par mutagenèse dirigée en utilisant le kit QuickChange II XL Site-Directed Mutagenesis de Stratagene. Les sites SRE ont été mutés suivant le schéma suivant :



### 7.3.2. Transfection transitoire dans les cellules musculaires humaines et HepG2

Les cellules musculaires humaines en culture primaire sontensemencées dans des plaques 12 puits recouverts de collagène I, et transfectées soit sous forme de myoblastes, soit sous forme de myotubes après 5 jours de différenciation. Les HepG2 sontensemencées dans des plaques 12 puits et transfectées à 80% de confluence.

La transfection transitoire est réalisée grâce au transfectant commerciale ExGen 500 (Euromedex, Souffelweyersheim, France), selon les recommandations du fournisseur.

Chaque puits de culture cellulaire reçoit 500 ng de plasmide rapporteur. Afin de tester la stimulation de leur activité promotrice par SREBP-1a ou 1c, chaque puit reçoit également 50 ng des vecteurs d'expression de SREBP-1a ou 1c, pCMV-hSREBP-1a ou pCMV-hSREBP-1c. Enfin, pour normaliser le signal luminescent en fonction de la quantité de cellules, les cellules sont cotransfectées avec 1 ng de pRL-CMV (Promega), vecteur d'expression de la luciférase Renilla, sous contrôle du promoteur CMV.

### 7.3.3. Mesure des activités promotrices

Les promoteurs de BHLHB2 et BHLHB3 ont été clonés en amont du rapporteur de la luciférase Firefly, alors que le vecteur de co-transfection exprime la luciférase Renilla, issue de la pansée de mer *Renilla reniformis*, catalysant l'oxydation de la coelenterazine, en émettant une lumière de longueur d'onde différente de celle produite par la luciférase Firefly. Ces deux luciférases ont donc des propriétés enzymatiques et des substrats différents, ce qui permet de mesurer séparément l'abondance relative de chacune.

Les deux activités Luciférase sont mesurées 36 à 48h après transfection à l'aide du kit Dual-Luciferase<sup>®</sup> Reporter Assay system (Promega) sur un luminomètre à plaque Centro LB 960 (Berthold Technology, Thoiry, France).

Pour chaque transfection, l'activité Luciférase issue des promoteurs BHLHB2 ou BHLHB3 est rapportée à la valeur de l'activité Renilla correspondante.



## RESULTATS EXPERIMENTAUX

### Article n° 1

**L'identification des gènes cibles de SREBP-1a et SREBP-1c dans le muscle squelettique par analyse transcriptomique met en évidence leur implication dans de nouvelles voies de régulations.**

Microarray analyses of SREBP-1a and SREBP-1c target genes identify new regulatory pathways in muscle. *Physiol Genomics* 34(3): 327-37

*Sophie Rome, Virginie Lecomte, Emmanuelle Meugnier, Jennifer Rieusset, Cyrille Debard, Vanessa Euthine, Hubert Vidal et Etienne Lefai.*





## Introduction

En tant que régulateurs majeurs du métabolisme des lipides et du cholestérol, les facteurs de transcription SREBP-1 sont principalement décrits dans le foie et le tissu adipeux, organes possédants des capacités lipogéniques élevées (Bennett and Osborne 2000). Dans ces tissus, le niveau d'expression des deux isoformes de SREBP-1 n'est pas identique ; l'expression de SREBP-1c est neuf fois, dans le foie, et trois fois, dans le tissu adipeux, plus élevée que l'expression de SREBP-1a (Shimomura *et al.* 1997). SREBP-1c est donc l'isoforme majoritaire dans le foie et le tissu adipeux. Dans le foie, son expression est stimulée par l'insuline ; SREBP-1c est ainsi considéré comme le médiateur des effets transcriptionnels de l'insuline dans le foie, notamment sur les enzymes lipogéniques et glycolytiques (Ferre and Foufelle 2007).

Des études menées par plusieurs laboratoires, dont le notre, montrent que SREBP-1a et SREBP-1c sont aussi exprimés par le muscle squelettique. Dans ce tissu, comme dans la plupart des organes SREBP-1c est l'isoforme majoritaire, cependant le ratio d'expression SREBP-1c/SREBP-1a est plus faible que dans le foie ou le tissu adipeux. Dans cet organe, l'expression de SREBP-1a est presque similaire à celle de SREBP-1c. De la même façon que dans le foie, SREBP-1c est régulé par l'insuline (Ducluzeau *et al.* 2001; Guillet-Deniau *et al.* 2002; Gosmain *et al.* 2004; Dif *et al.* 2006). Contrairement au foie et au tissu adipeux, le muscle n'est pas considéré comme un organe très lipogénique. Néanmoins, le muscle squelettique est un site majeur d'oxydation des acides gras. De plus, il contient d'importants stocks de triglycérides intramyocytaires dont le volume varie selon les conditions métaboliques (Starling *et al.* 1997; Bergman *et al.* 1999; Malenfant *et al.* 2001). L'expression musculaire de SREBP-1 est soumise, de la même façon, aux variations nutritionnelles et à l'activité physique (Ikeda *et al.* 2002 ; Gosmain *et al.* 2005 ; Nadeau *et al.* 2006; Tsintzas *et al.* 2006 ). Cependant, le rôle des facteurs SREBP-1 dans le muscle squelettique reste obscur, très peu de gènes cibles ayant été identifiés dans ce tissu.

Le nombre de gènes cibles de SREBP identifiés, soit dans le foie de souris transgéniques, soit dans des ilots pancréatiques isolés, soit dans des fibroblastes surexprimant SREBP, s'accroît considérablement grâce à la technologie des puces ADN. Dans ces précédentes études, la surexpression de SREBP induit des modifications dans l'expression

d'un grand nombre de gènes non liés au métabolisme des acides gras ou à la lipogenèse, suggérant l'implication de ces facteurs dans des fonctions cellulaires indépendantes de la régulation métabolique. Dans le muscle, aucune étude à large échelle des cibles transcriptionnelles de SREBP-1a ou SREBP-1c n'a encore été réalisée.

De plus, les deux isoformes SREBP-1a et SREBP-1c sont exprimées à des niveaux comparables dans le muscle squelettique, alors que SREBP-1a n'est pas exprimé dans le foie ou le tissu adipeux. Le muscle est donc un bon modèle pour étudier les différences d'activation transcriptionnelle entre les isoformes SREBP-1a et SREBP-1c.

Enfin, ces deux isoformes possédant des capacités transcriptionnelles différentes, les gènes cibles de SREBP-1 dans le muscle squelettique pourraient répondre de façon différente à ce qui est observé dans le foie ou le tissu adipeux.

Afin de valider ces hypothèses, nous avons réalisé, une analyse transcriptomique de myotubes humains en culture primaire surexprimant soit SREBP-1a soit SREBP-1c, à l'aide de puces à ADN pangénomiques. La surexpression des formes nucléaires de SREBP-1a et SREBP-1c a été réalisée à l'aide d'adénovirus recombinants construits au laboratoire. Nous avons ainsi identifié plusieurs groupes de gènes régulés par SREBP-1a et/ou SREBP-1c dans le muscle squelettique humain.

**Sophie Rome, Virginie Lecomte, Emmanuelle Meugnier, Jennifer Rieusset, Cyrille Debard, Vanessa Euthine, Hubert Vidal and Etienne Lefai**

*Physiol Genomics* 34:327-337, 2008. First published Jun 17, 2008;  
doi:10.1152/physiolgenomics.90211.2008

**You might find this additional information useful...**

---

Supplemental material for this article can be found at:

<http://physiolgenomics.physiology.org/cgi/content/full/90211.2008/DC1>

This article cites 54 articles, 32 of which you can access free at:

<http://physiolgenomics.physiology.org/cgi/content/full/34/3/327#BIBL>

This article has been cited by 3 other HighWire hosted articles:

**A New Role for Sterol Regulatory Element Binding Protein 1 Transcription Factors in the Regulation of Muscle Mass and Muscle Cell Differentiation**

V. Lecomte, E. Meugnier, V. Euthine, C. Durand, D. Freyssenet, G. Nemoz, S. Rome, H. Vidal and E. Lefai

*Mol. Cell. Biol.*, March 1, 2010; 30 (5): 1182-1198.

[\[Abstract\]](#) [\[Full Text\]](#) [\[PDF\]](#)

**Evolutionary conservation and adaptation in the mechanism that regulates SREBP action: what a long, strange tRIP it's been**

T. F. Osborne and P. J. Espenshade

*Genes & Dev.*, November 15, 2009; 23 (22): 2578-2591.

[\[Abstract\]](#) [\[Full Text\]](#) [\[PDF\]](#)

**The microRNA Signature in Response to Insulin Reveals Its Implication in the Transcriptional Action of Insulin in Human Skeletal Muscle and the Role of a Sterol Regulatory Element-Binding Protein-1c/Myocyte Enhancer Factor 2C Pathway**

A. Granjon, M.-P. Gustin, J. Rieusset, E. Lefai, E. Meugnier, I. Guller, C. Cerutti, C. Paultre, E. Disse, R. Rabasa-Lhoret, M. Laville, H. Vidal and S. Rome

*Diabetes*, November 1, 2009; 58 (11): 2555-2564.

[\[Abstract\]](#) [\[Full Text\]](#) [\[PDF\]](#)

Updated information and services including high-resolution figures, can be found at:

<http://physiolgenomics.physiology.org/cgi/content/full/34/3/327>

Additional material and information about *Physiological Genomics* can be found at:

<http://www.the-aps.org/publications/pg>

---

This information is current as of February 15, 2010 .

## Microarray analyses of SREBP-1a and SREBP-1c target genes identify new regulatory pathways in muscle

Sophie Rome,\* Virginie Lecomte,\* Emmanuelle Meugnier, Jennifer Rieusset, Cyrille Debard, Vanessa Euthine, Hubert Vidal, and Etienne Lefai

INSERM U870; INRA UMR1235; Régulations Métaboliques, Nutrition, et Diabètes; Université Lyon 1; Faculté de Médecine Lyon-Sud, Oullins; INSA-Lyon, RMND, Villeurbanne; and Hospices Civils de Lyon (Service de Diabétologie et Nutrition, Hôpital Edouard Herriot), Lyon, France

Submitted 7 April 2008; accepted in final form 16 June 2008

**Rome S, Lecomte V, Meugnier E, Rieusset J, Debard C, Euthine V, Vidal H, Lefai E.** Microarray analyses of SREBP-1a and SREBP-1c target genes identify new regulatory pathways in muscle. *Physiol Genomics* 34: 327–337, 2008. First published June 17, 2008; doi:10.1152/physiolgenomics.90211.2008.—In this study we have identified the target genes of sterol regulatory element binding protein (SREBP)-1a and SREBP-1c in primary cultures of human skeletal muscle cells, using adenoviral vectors expressing the mature nuclear form of human SREBP-1a or SREBP-1c combined with oligonucleotide microarrays. Overexpression of SREBP-1a led to significant changes in the expression of 1,315 genes (655 upregulated and 660 downregulated), whereas overexpression of SREBP-1c modified the mRNA level of 514 genes (310 upregulated and 204 downregulated). Gene ontology analysis indicated that in human muscle cells SREBP-1a and -1c are involved in the regulation of a large number of genes that are at the crossroads of different functional pathways, several of which are not directly connected with cholesterol and lipid metabolism. Six hundred fifty-two of all genes identified to be differentially regulated on SREBP overexpression had a sterol regulatory element (SRE) motif in their promoter sequences. Among these, 429 were specifically regulated by SREBP-1a, 69 by SREBP-1c, and 154 by both 1a and 1c. Because both isoforms recognize the same binding motif, we determined whether some of these functional differences could depend on the environment of the SRE motifs in the promoters. Results from promoter analysis showed that different combinations of transcription factor binding sites around the SRE binding motifs may determine regulatory networks of transcription that could explain the superposition of lipid and cholesterol metabolism with various other pathways involved in adaptive responses to stress like hypoxia and heat shock, or involvement in the immune response.

transcription factor; DNA binding motif; promoter; adenovirus; skeletal muscle; human

STEROL REGULATORY ELEMENT binding proteins (SREBPs) belong to the basic-helix-loop-helix leucine zipper (bHLHLZ) family of DNA-binding proteins that play fundamental roles in both cholesterol and fatty acid metabolism (36). Three isoforms have been identified in mammalian tissues that vary in structure, regulation, and function. SREBP-1a and SREBP-1c (originally cloned as ADD1; Ref. 47) are protein products of alternative promoter usage of the *srebf1* gene, whereas SREBP-2 is transcribed from a different gene.

\* S. Rome and V. Lecomte contributed equally to this work.

Address for reprint requests and other correspondence: S. Rome, UMR INRA 1235/INSERM 870, Régulations Métaboliques, Nutrition et Diabètes, Faculté de Médecine Lyon Sud-BP 12, 165 chemin du Grand Revoyet, F-69921 Oullins Cedex, France (e-mail: srome@univ-lyon1.fr).

These unique members of the bHLHLZ family of transcriptional regulatory proteins can be distinguished from other family members by two characteristics. First, they are synthesized as precursors. The amino-terminal half of the precursor is clipped out of the membrane in two steps responding to regulatory cues that signal the need for increased cellular cholesterol (2). The released amino-terminal protein activates the expression of SREBP target genes. The second distinguishing feature of the SREBPs is that they have an atypical tyrosine residue in the conserved basic DNA binding domain (24), which allows binding to the direct repeat sterol regulatory element (SRE) 5'-TCACNCCAC-3' (50). SREBP-1a and SREBP-1c differ only in the first exon, which encodes a longer acidic transactivation domain for SREBP-1a, thus conferring a stronger activation potential compared with SREBP-1c (48).

Most of what is known regarding the function of SREBP-1 has come from studies in tissues of high lipogenic capacity, such as liver and adipose tissue. It has been demonstrated that the ratios of the relative levels of SREBP-1a and SREBP-1c mRNA vary in these tissues. In liver and adipose tissue, SREBP-1c mRNA is nine- and threefold more abundant, respectively, than SREBP-1a (44). Because SREBP-1c mRNA is the predominant isoform in adult liver and adipose tissue, it is likely to be the key protein involved in SREBP-1-dependent processes in these tissues. Indeed, in the liver insulin upregulates SREBP-1c expression, and this isoform has been proposed to mediate the transcriptional effects of insulin on lipogenic and glycolytic enzymes (13).

We (12, 16) and others (17) have demonstrated that SREBP-1a and -1c are also expressed in skeletal muscle. In this tissue, SREBP-1c is also regulated by insulin (8, 17). Unlike adipose tissue and liver, skeletal muscle is not regarded as being highly lipogenic. Nonetheless, muscle triglyceride stores are substantial and vary under a number of metabolic conditions (1, 32, 45). Skeletal muscle is also a major site for fatty acid oxidation (38). Until now, the role of SREBP-1a and -1c in skeletal muscle has remained unclear, because few of their target genes have been identified.

While identification of new SREBP target genes dramatically increased with microarray analysis of livers from transgenic mice overexpressing SREBP-1a or SREBP-2 (20), of isolated rat islets transfected with SREBP-1c (9), or of fibroblasts transfected with SREBP-1a (23), no information on the targets for SREBP-1a and/or SREBP-1c in human muscle cells

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. The article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

is presently available at the transcriptome level. Interestingly, in these previous studies, the overexpression of SREBP isoforms led to changes in the expression of a large number of genes not directly related to fatty acid metabolism and lipogenesis. Thus we suspected that SREBP-1 might also be involved in the regulation of important cellular functions in skeletal muscle. Moreover, because two SREBP-1 isoforms exist with different potencies, we postulated that some of their target genes might be different. To validate this hypothesis, and to define the molecular function of SREBP-1 in skeletal muscle, we performed microarray analysis on human primary myotubes overexpressing either SREBP-1a or SREBP-1c and identified clusters of genes regulated by SREBP-1a and/or SREBP-1c.

## MATERIALS AND METHODS

**Primary cultures of human skeletal muscle cells.** Differentiated myotubes were prepared from three different skeletal muscle biopsies according to a procedure previously described in detail (7, 39). Briefly, skeletal muscle tissue samples were obtained from three healthy lean volunteers who participated in a global study on insulin action on gene expression. The experimental protocol was approved by the Ethical Committees of the Hospices Civils de Lyon (agreement number 2003/039/125A). After differentiation, cells showed polynucleated status and expressed specific markers of human skeletal muscle such as creatine kinase, sarcomeric  $\alpha$ -actin, and myosin. There were no apparent differences among cultured skeletal muscle cells from the three control subjects (2 men and 1 woman).

**Generation of recombinant adenoviruses encoding mature forms of human SREBP-1a and SREBP-1c.** The construction of the expression vectors encoding the mature nuclear forms of human SREBP-1a (pCMV-hSREBP-1a) and SREBP-1c (pCMV-hSREBP-1c) was described previously (8). Recombinant adenoviral genomes carrying the mature forms of human SREBP-1a and SREBP-1c were generated by homologous recombination and amplified as described previously (6). Skeletal muscle myotubes were grown in six-well plates. After 7 days of differentiation, myotubes were infected for 48 h with recombinant adenovirus expressing *Renilla* (control), nuclear SREBP-1a, or nuclear SREBP-1c. We used  $5 \times 10^7$  infection units of recombinant adenovirus for a 3-cm well of differentiated cells.

**Total RNA preparation and amplification.** Total RNA was extracted from infected human myotubes with TRIzol reagent (Invitrogen Life Technologies). RNA integrity was determined with the Agilent 2100 Bioanalyzer and RNA 6000 labChip Kit (Agilent Technologies, Massy, France). Five hundred nanograms of total RNA was amplified with the Amino Allyl MessageAmp II aRNA kit (Ambion, Austin, TX) according to the manufacturer's instructions.

**Probe labeling and microarray hybridization.** Fluorescent probes were synthesized by chemical coupling of 5  $\mu$ g of aminoallyl aRNA with cyanine (Cy3 or Cy5) dyes (GE Healthcare Biosciences, Orsay, France). After purification with an RNeasy Mini Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France), probes were fragmented with 25 $\times$  RNA Fragmentation Reagents (Agilent Technologies) and hybridized with 2 $\times$  Agilent Hybridization Buffer (Agilent Technologies) to RNG/MRC human pangenomic microarrays (26) in an Agilent oven at 62°C for 16 h. Microarrays were washed and scanned with a Genepix 4000B scanner (Axon Instruments, Foster City, CA).

**Microarray analysis.** The oligonucleotide microarrays produced by the French Genopole Network (RNG) consisted of 25,342 oligonucleotides of 50-mers printed on glass slides. TIFF images were analyzed with Genepix Pro 4.0 software (Axon Instruments). Signal intensities were log-transformed, and normalization was performed by the intensity-dependent Lowess method. To compare results from the different experiments, data from each slide were normalized in log space to have a mean of zero with Cluster 3.0 software. Only spots

with recorded data on the six slides (3 for SREBP-1a and 3 for SREBP-1c) were selected for further analysis. With these selection criteria, 12,825 spots were retrieved. Data were analyzed with the one-class significance analysis of microarrays (SAM) procedure (49).

Microarray data are available in the GEO database under number GSE10918 with the link <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?token=xbwnjumqwscykn&acc=GSE10918>.

**Quantitation of mRNAs with real-time RT-PCR.** First-strand cDNAs were synthesized from 500 ng of total RNA in the presence of 100 U of Superscript II (Invitrogen, Eragny, France) and a mixture of random hexamers and oligo(dT) primers (Promega, Charbonnières, France). Real-time PCR assays were performed with a LightCycler (Roche Diagnostics, Meylan, France). A list of the PCR primers is available on request ([lelai@univ-lyon1.fr](mailto:lelai@univ-lyon1.fr)).

**Chromatin immunoprecipitation.** Protein-DNA complexes were fixed by formaldehyde and treated as described previously (35). Sonicated chromatin was divided into three aliquots of 50  $\mu$ g. One aliquot was incubated overnight at 4°C with 8  $\mu$ g of SREBP-1 antibody [Santa-Cruz Biotechnology (H-160)]. As negative control for immunoprecipitation (mock), 50  $\mu$ g of sonicated chromatin was incubated overnight with Tris-EDTA (TE) buffer (10 mM Tris·HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA) at 4°C. The remaining 50  $\mu$ g of chromatin was used as PCR positive control (input). Protein A Sepharose beads (Pharmacia Biotech) were used to collect the antibody-chromatin complexes for 3 h at 4°C. After washing, the beads were successively treated with DNase-free RNase A (50  $\mu$ g/ml, Qiagen) for 30 min at 37°C and proteinase K (20 mg/ml, Qiagen) at 37°C overnight. DNA was extracted and resuspended in 80  $\mu$ l of water for quantification. PCR amplification of target sequences was performed in reactions containing 4  $\mu$ l of either immunoprecipitates or input. After amplification, PCR products were analyzed on 3% agarose gel. A list of primers is available on request ([meugnier@univ-lyon1.fr](mailto:meugnier@univ-lyon1.fr)).

**Analysis of gene promoter sequences.** The promoter sequences (1,000 bp upstream of the transcription starting site) of the genes with significant changes in mRNA levels following the overexpression of SREBP-1a or SREBP-1c were retrieved from TRASER (<http://genome-www6.stanford.edu/cgi-bin/Traser/traser>). We then used MatInspector from the Genomatix software package (Genomatix Suite release 3.0, Munich, Germany) to obtain the list of all the transcription factors that have putative binding sites on these promoter sequences (5).

**Measurement of glucose oxidation.** Myotubes in six-well plates were incubated for 3 h with 5 mM glucose-DMEM supplemented with D-[U-<sup>14</sup>C]glucose (1  $\mu$ Ci/ml) (Perkin Elmer, Courtaboeuf, France). The incubation media were then transferred to new vials. After acidification with 5 N HCl, <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> was trapped in Carbosorb (Packard Instruments) and then measured by scintillation counting in Ultima-Gold (Packard Instruments). Cells were washed twice in ice-cold PBS and scraped in PBS supplemented with 0.1% sodium dodecyl sulfate (SDS). Protein concentrations were measured with the Bio-Rad assay (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France). The glucose oxidation rate was calculated as the amount of produced CO<sub>2</sub> per hour and milligram of protein.

**Measurement of glycogen synthesis.** Myotubes in six-well plates were incubated for 3 h with 5 mM glucose-DMEM supplemented with 12.5 mmol/l HEPES and containing 37 kBq/ml D-[U-<sup>14</sup>C]glucose (1  $\mu$ Ci/ml; Perkin Elmer). The incubation media were then transferred to new vials. After incubation cells were washed twice with PBS and scraped in PBS supplemented with 0.1% SDS. Glycogen was extracted as described previously (7), and the amount of [<sup>14</sup>C]glucose incorporated into glycogen was determined by scintillation counting.

**Protein analysis by Western blotting.** Myotubes in six-well plates were lysed at 4°C in (mM) 200 NaF, 20 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 150 NaCl, 50 HEPES, 4 NaVO<sub>4</sub>, 10 EDTA, and 2 PMSF, with 1% Triton X and 10% glycerol. After quantification by the Bradford assay (Bio-Rad), proteins were separated by SDS-10% PAGE and transferred to polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane. Membranes were incubated



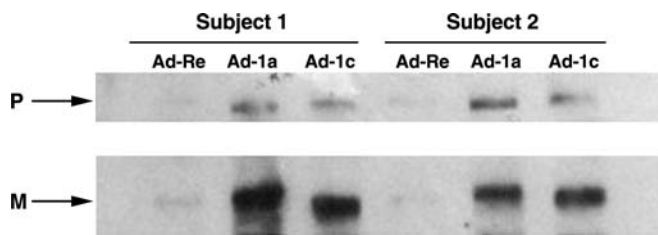


Fig. 1. Immunoblot of sterol regulatory element binding protein (SREBP)-1 after adenoviral overexpression of *Renilla* (Ad-Re), SREBP-1a (Ad-1a), and SREBP-1c (Ad-1c) in 2 human differentiated cultured myotubes. Each well of a 6-well plate was incubated for 48 h with  $5 \times 10^7$  infection units of corresponding recombinant adenoviruses. Western blot was performed with total cell extract and H-160 (SCBT) antibody. P, precursor proteins (125 kDa); M, mature nuclear proteins (70 kDa).

overnight with primary antibody. The signal was detected with a horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody and revealed with an enhanced chemiluminescence system (Pierce, Rockford, IL). Primary antibodies used were SREBP-1 (H160), FASN (H300), Insig-1 (N19), SIRT-1 (H300), and LaminB1 (H90) from Santa Cruz Biotechnology and ACC (3662) from Cell Signaling.

## RESULTS

**Microarray data analysis.** In this study we used adenoviral vectors expressing the mature nuclear forms of human SREBP-1a or SREBP-1c combined with oligonucleotide microarrays to determine the target genes of SREBP-1a and SREBP-1c in primary cultures of human skeletal muscle cells. We have previously verified (8) that with adenovirus infection, both SREBP-1 isoforms are overexpressed in human muscle cells at the mRNA level by quantitative RT-PCR (qRT-PCR) and at the protein level by Western blotting. Importantly, the 10- to 20-fold increase in SREBP-1a or -1c protein levels observed after adenoviral infection is similar to the increase in SREBP-1 after insulin stimulation in vivo (15, 16, 19) (Fig. 1). Our experimental conditions are thus close to physiological conditions.

For microarray analysis, only spots with recorded data on all slides were selected for further analysis, which led to the analysis of a subset of 12,825 spots among the 25,342 spots initially spotted on the arrays. Using a false discovery rate (FDR) of 1%, the SAM procedure sorted out a list of 1,315 genes significantly regulated by SREBP-1a (655 up- and 660 downregulated) and 514 genes significantly regulated by SREBP-1c (310 up- and 204 downregulated) (Supplemental Table S1).<sup>1</sup> Because this complex pattern of gene expression was the result of a combination of posttranscriptional and/or posttranslational mechanisms, mRNA levels could not be directly linked to metabolic pathways. Thus we focused this study on analysis of the functional pathways affected by the overexpression of SREBP-1 rather than on the analysis of specific genes, and we performed a global gene promoter analysis rather than a study of cell metabolism.

Gene Ontology annotations SOURCE and KEGG were used to assign the regulated genes into functional categories. As shown in Supplemental Table S1, genes identified to associate with metabolism were mainly related to lipid (45 genes), cholesterol (19 genes), and carbohydrate (28 genes) metabo-

lism. Although these functions are coherent with the role of SREBPs described in other tissues (43), they represented only 6% of the genes regulated by SREBP-1a and/or -1c in the human myotubes. In fact, the majority of the regulated genes encoded proteins involved in transcriptional and translational regulation (20%). One hundred ten genes encoded transcription factors regulated by one or both isoforms. This result indicated that besides the regulation of the lipid pathway, SREBP-1a and/or -1c are at the origin of a complex network of gene regulation in human skeletal muscle. The other functional categories affected by SREBP overexpression were composed of genes related to intracellular signaling (10%), cytoskeleton and vesicle trafficking (7%), receptors, carriers, and transporters (5%), mitochondrial respiration and oxidoreduction (4%), immune response and inflammation (3%), regulation of cell cycle and proliferation (3%), and apoptosis (2%).

To validate the microarray results, changes in mRNA expression of genes implicated in different cellular pathways not directly connected with the lipid metabolism were verified by qRT-PCR (Table 1). Quantitative PCR results were in accordance with the microarray data and confirmed their regulation by both SREBP-1 isoforms.

**Direct target genes of SREBP-1a and SREBP-1c in human myotubes.** To identify the genes that may be direct targets of SREBP-1 as opposed to genes whose expression results from an indirect effect of the forced expression of SREBP-1a and 1c, we used the Genomatix software package to search for SRE motifs in the promoters of the regulated genes. We found 652 genes with a SRE motif in their proximal promoters (Supplemental Table S1), of which 583 were regulated by SREBP-1a (318 up- and 265 downregulated) and 223 by SREBP-1c (143 up- and 80 downregulated). Thus ~44% of the 1,490 SREBP-1a- and/or SREBP-1c-regulated genes in human myotube cells were potential direct targets of these transcription factors.

We performed chromatin immunoprecipitation (ChIP) assays to confirm the in vivo DNA binding of SREBP-1a and/or -1c to the promoter sequences of nine genes with SRE motifs. Because there were no specific antibodies commercially available for SREBP-1a and -1c separately, chromatin was immunoprecipitated with a SREBP-1 antibody that recognized both isoforms. The results indicate that SREBP-1 binds elements in

Table 1. Fold changes in mRNA levels during overexpression of SREBP-1a or SREBP-1c in human myotubes

Symbols	LLID	Overexpression of SREBP-1a		Overexpression of SREBP-1c	
		Microarray Fold Changes	qRT-PCR Fold Changes	Microarray Fold Changes	qRT-PCR Fold Changes
BHLHB2	8553	1.69	1.48 ± 0.45*	1.31	1.22 ± 0.44*
EIF3S1	8669	1.60	1.33 ± 0.51*	1.89	1.99 ± 0.43*
FABP3	2170	4.48	5.42 ± 2.6*	1.69	2.81 ± 1.64*
GLUT4	6517	NF	4.96 ± 1.02*	NF	3.25 ± 0.83*
PGM3	5238	1.61	1.94 ± 0.94*	1.39	1.90 ± 0.16*
STAR	6770	7.83	1.33 ± 0.38*	3.05	1.29 ± 0.42*
JAM2	58494	0.27	0.14 ± 0.04*	0.49	0.25 ± 0.015*

Values were corrected by the mRNA level of hypoxanthine phosphoribosyltransferase (HPRT) used for normalization. SREBP, sterol regulatory element binding protein; LLID, LocusLink ID; qRT-PCR, quantitative RT-PCR; NF, not found. \* $P < 0.05$ , after vs. before transfection, by Student's paired test.

<sup>1</sup> The online version of this article contains supplemental material.

Fig. 2. Results from chromatin immunoprecipitation (ChIP) assays performed to verify DNA binding of SREBP-1s on the promoter sequences of some genes identified by microarray analysis. The negative control primers flank a region of DNA that should not be bound by SREBP-1 [exon 2 of hexokinase 2 (HK2) with no sterol regulatory element (SRE) binding site]. These primers are used on immunoprecipitated DNA to confirm that antibody enrichment of a target DNA is due to specific immunoprecipitation of the protein target rather than a nonspecific precipitation of total DNA. Note: the negative control primers give an amplification product because ChIP is an enrichment of DNA bound by a particular protein, not a complete purification of the DNA of interest. If enough PCR cycles are used, it is always possible to get a PCR product for a given target locus. AB, ChIP with antibody against SREBP-1; Mock, ChIP without antibody (control); Input, sonicated chromatin (control). The SREBP-1 putative motifs are given for each gene.

Gene name	SRE sequences	Gel ChIP			SREBP1 binding
		Input	Mock	AB	
HK2 (exon2)	Negative control				No
ARF4	<b>TATCACCCCG</b>				Yes
SPOP	<b>ATCGCACCAC</b>				Yes
FEM1b	<b>GACACCCAC</b>				Yes
VPS29	<b>TACCACCCCG</b>				Yes
HK2	<b>CTCCCCCACC</b> (positive control)				Yes
HIGD1A	<b>CTTCTCCCAC</b>				Yes
PGRMC2	<b>CTCGCCCCAC</b>				Yes
SDC1	<b>AACGCCCCAC</b>				Yes
SF1	<b>TTCGCCCCAC</b>				Yes

the promoters of the ARF4, SPOP, FEM1b, VSP29, HIGD1A, PGRMC2, SDC1, and SF1 genes (Fig. 2) and support the results of the microarray analysis.

Among the 652 potential target genes of SREBP-1 in human skeletal muscle identified to contain a SRE, 429 genes were specifically regulated by SREBP-1a, 69 by SREBP-1c, and 154 by both isoforms. Thus SREBP-1a regulated almost sixfold the number of genes regulated by SREBP-1c. In addition, the mRNA levels of the 154 genes regulated by both isoforms were globally higher when cells were infected by SREBP-1a than when transfected by SREBP-1c, either for the up- or down-regulated genes. (Fig. 3). This result is in agreement with the

fact that the two isoforms differ in their ability to stimulate transcription and that SREBP-1c is a less efficient transcriptional activator than SREBP-1a. Moreover, it was demonstrated previously that SREBP-1a and SREBP-1c proteins can bind the SREBP-1c promoter of the human *sreb-1* gene. Conversely, SREBP-1a expression is not regulated by SREBP-1a or -1c. Thus, in our experiment, it seems likely that the overexpression of SREBP-1a led to the activation of SREBP-1c promoter, and that both endogenous and adenovirus-derived isoforms regulated gene expression. Together, these results help to explain the higher fold changes observed for the genes regulated by SREBP-1a.

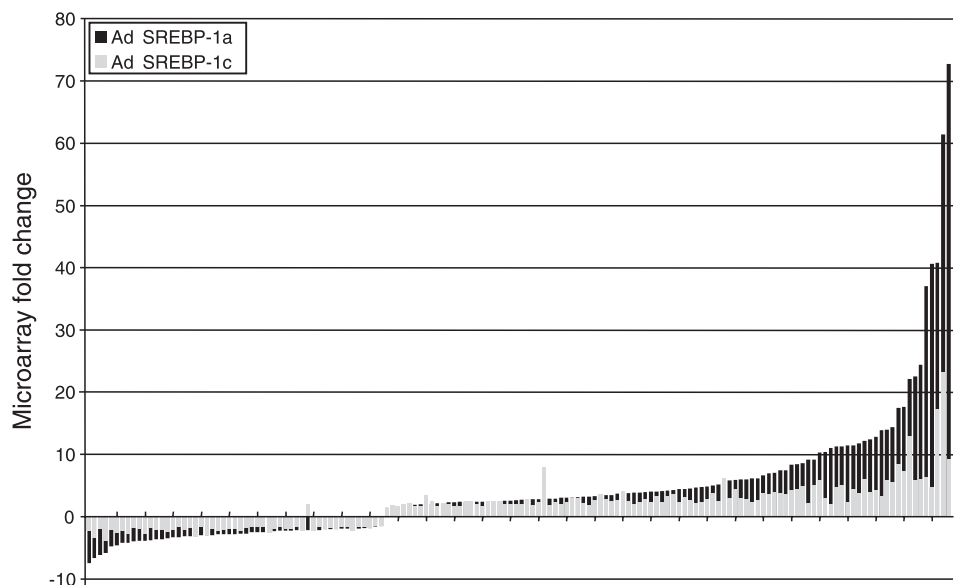


Fig. 3. Fold changes of the 154 genes regulated by both SREBP-1a and SREBP-1c in primary human myotubes. The 154 genes are ordered with respect to increasing fold change on infection with Ad-SREBP-1a.



We then determined which biological terms displayed differential distribution between the 652 genes with a SRE motif and the 838 genes with no SRE by using FatiGO<sup>+</sup> (<http://babelomics.bioinfo.cipf.es>) and KEGG (<http://www.genome.jp/>). The results showed that the biological pathways involved in inflammatory response, cellular morphogenesis and adhesion, and carbohydrate and sterol metabolism were significantly enriched in genes containing a SRE motif (Table 2).

*Glucose oxidation and glycogen synthesis in myotubes overexpressing SREBP-1a and/or -1c.* To confirm the impact of the overexpression of SREBP-1a and -1c on carbohydrate metabolism, we investigated glucose oxidation and glycogen synthesis in infected human myotubes overexpressing SREBP-1. As shown in Fig. 4, we found that rates of glucose oxidation were significantly increased by fold changes of  $1.79 \pm 0.21$  ( $P < 0.05$ ) and  $1.64 \pm 0.15$  ( $P < 0.05$ ) in cells overexpressing SREBP-1a or -1c, respectively. At the same time, glycogen synthesis was also increased by both SREBP-1a (fold change of  $1.42 \pm 0.14$ ) and SREBP-1c (fold change of  $1.36 \pm 0.22$ ). Because overexpression of SREBP-1a and -1c also led to an increase of GLUT4 mRNA (Table 1), glucose uptake is increased and metabolized through both oxidation and glycogen storage.

*Protein levels in myotubes overexpressing SREBP-1a and/or -1c.* To demonstrate that the microarray data are consistent with changes in protein levels in SREBP-1 overexpressing myotubes, the protein levels of several target genes were analyzed by Western blotting (Fig. 5). We first tested two proteins involved in fatty acid metabolism and showed that protein levels of fatty acid synthase (FAS) and acetyl-CoA carboxylase (ACC) are upregulated by SREBP-1, with a major effect with SREBP-1a. As previously demonstrated (8), insulin-induced gene-1 (INSIG-1) protein level is also increased on SREBP-1 overexpression. The relevance of the microarray data was also tested with another independent protein, the histone deacetylase sirtuin-1 (SIRT-1). Microarray data showed SIRT-1 mRNA increase only on SREBP-1c overexpression, but Western blot analysis indicated that SIRT-1 protein levels are increased in both SREBP-1a- and SREBP-1c-overexpressing myotubes. Together, these results indicate that although protein levels are mostly consistent with microarray data, caution should be taken when stating the specificity of SREBP-1a versus -1c on target gene expression.

*Promoter analysis.* Because it has been demonstrated that SREBPs are weaker transcriptional activators in isolation than when they function in combination with coregulatory proteins that bind to neighboring sites (4, 33, 34, 46, 52, 53), we wished to determine whether other transcription factors (TFs) were specifically associated with SREBP-1a and -1c in the promoter sequences of the 652 genes with SRE motifs by comparison with the genes without SRE motifs, but also regulated during the overexpression (i.e., 838 genes). *z* scores were calculated for each of the TFs identified. Table 3 showed that 31 TF matrixes had significantly different occurrences (*z* score > 1.96) in the set of genes with a SRE motif.

It appeared that SRE motifs were always associated with the V\$SP1F matrix that binds TFs related to the TF Sp1. In addition, all the SRE motifs were associated with RXR heterodimer binding sites (V\$RXRF) for nuclear receptors like liver X receptors, retinoic acid receptors, thyroid hormone receptors, and vitamin D receptor, known to be involved in

Table 2. Significant biological pathways displaying differential distribution between genes with a SRE motif in their promoter sequence and those with no SRE motif

Gene Ontology	Gene Ontology Biological Process Level	No. of Genes with SRE Motif	No. of Genes Without SRE Motif	% of Genes with SRE Motif	% of Genes Without SRE Motif	Unadjusted <i>P</i> Value	<i>z</i> Scores (significant if > 1.96)
Cell projection biogenesis	8	7	0	1.39	0	0.0045	2.9
Cell projection organization and biogenesis	7	15	7	2.99	1.64	0.049	2.14
Cell projection morphogenesis	6	15	7	2.99	1.34	0.049	2.14
Inflammatory response	5	18	6	3.59	1.09	0.006	2.9
Inorganic anion transport	7	10	2	1.99	0.47	0.0158	2.64
Anatomic structure morphogenesis	4	59	45	11.75	7.67	0.0174	2.39
Cell morphogenesis	5	31	19	6.18	3.46	0.0286	2.38
Main pathways of carbohydrate metabolic process	6	14	5	2.79	0.96	0.0190	2.48
Cellular carbohydrate metabolic process	8	28	17	5.58	3.10	0.0325	2.28
Fructose metabolic process	5	4	0	0.80	0	0.0459	2.19
Fertilization	4	4	0	0.80	0	0.04	2.19
Lipid transport	5	2	11	0.40	2	0.0260	2.3
KEGG pathways							
Focal adhesion		21	7	10.24	2.99	0.0027	3.16
Cell communication		10	3	4.88	1.28	0.0443	2.28
Fructose and mannose metabolism		7	1	3.41	0.43	0.0281	2.39
Fcε RI signaling pathway/immune response		7	1	3.41	0.43	0.0281	2.39
Terpenoid biosynthesis/sterol biosynthesis		4	0	1.95	0	0.0468	2.19

Gene Ontology analysis was performed on 502 genes with a sterol regulatory element (SRE) motif and 598 genes without a SRE motif; KEGG pathway analysis was performed on 205 genes with a SRE motif and 234 genes without a SRE motif. *z* scores (comparison of two proportions) were used to calculate the enrichment of genes in each biological pathway; a significant difference corresponded to a *z* score > 1.96.

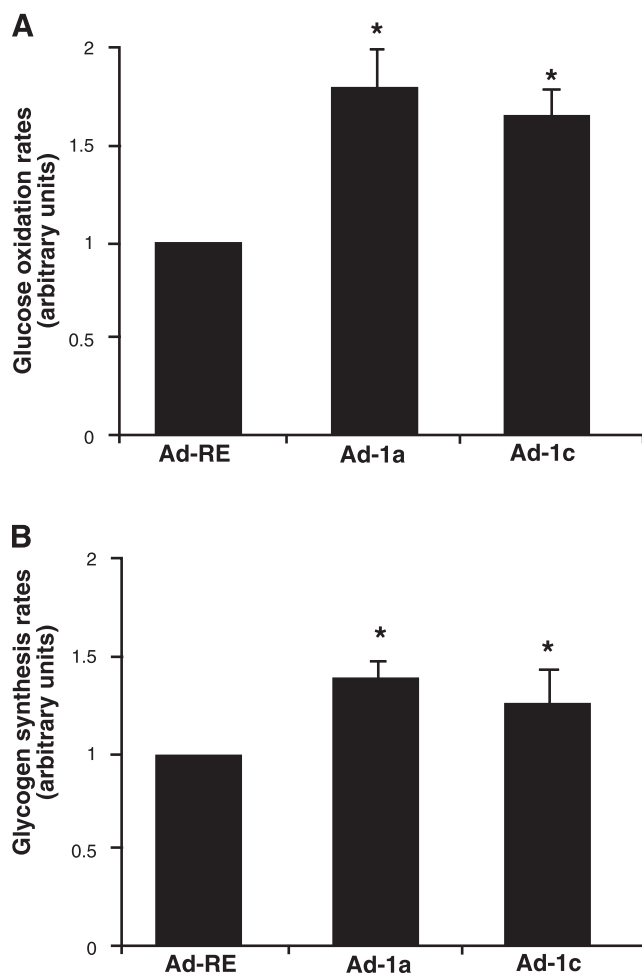


Fig. 4. Glucose oxidation (A) and glycogen synthesis (B) rates in primary human myotubes infected with adenoviruses expressing *Renilla* (Ad-RE), *Srebp-1a* (Ad-1a), and *Srebp-1c* (Ad-1c). Fold inductions are expressed as arbitrary units. \*Significant fold inductions,  $P < 0.05$  by Student's paired test.

lipid metabolism. Besides these two TF matrixes, almost all the SRE binding motifs were also associated with DNA binding motifs for TFs implicated in muscle development and differentiation (V\$EGRF and V\$E2FF) or that mediated cAMP signaling (V\$CREB). Finally, SRE binding motifs were associated to matrixes related to hypoxia (V\$HIF1) or that bind TFs regulated by hypoxia (V\$HESF, V\$ZF5F).

*SRE motif environment in promoters of genes regulated by SREBP-1a or SREBP-1c.* We then further analyzed the specificity of SREBP-1a and SREBP-1c in terms of their target genes. Because both isoforms recognized the same binding motif, we postulated that some of these functional differences would rely on the environment of the SRE motif in the promoters. To validate this hypothesis we searched for TF matrixes that were enriched in the promoters of the 429 SREBP-1a-regulated genes and in the promoters of the 69 SREBP-1c-regulated genes. Table 4A shows that two TF matrixes, V\$HEAT, the DNA motif for heat shock factors, and V\$GZF1, recognized by ZNF336 involved in development and morphogenesis, displayed significantly different rates of occurrence ( $z$  score  $> 1.96$ ) in the promoter data set of 429 SREBP-1a genes versus the genes regulated by both isoforms.

Table 4B shows the TF matrixes with significantly different rates of occurrence in the promoter data set of the 69 SREBP-1c genes versus the genes regulated by both isoforms. The majority of the 69 promoters had DNA motifs for CCAAT binding factors (V\$CAAT), which are ubiquitous TFs involved in positive regulation of transcription from RNA polymerase II promoters, and for p53 tumor suppressors (V\$P53F) involved in apoptosis. The other matrixes bind TFs involved in cellular defense response, inflammatory response (V\$AP1F, V\$OCTP, v\$AIRE), and TGF- $\beta$  signaling (V\$FAST).

#### DISCUSSION

In the present study we have deciphered, for the first time, the pattern of target genes regulated by SREBP-1 in a model of human skeletal muscle cells with the use of pangenomic microarray combined with the overexpression of the mature nuclear forms of SREBP-1a and SREBP-1c. Moreover, we have also analyzed the specific transcriptional role of SREBP-1a and SREBP-1c individually, in order to discriminate between the isoforms in terms of target genes and related functions.

As observed in previous analyses of livers from transgenic mice overexpressing SREBP-1a or SREBP2 (20), isolated rat islets transfected with SREBP-1c (9), or fibroblasts transfected with SREBP-1a (23), we found that SREBP-1a and/or SREBP-1c led to changes in the expression of a large number of genes in human muscle cells (i.e., 1,490 genes representing 12% of all genes analyzed on the microarrays).

Functional analyses of the 1,490 genes regulated by one or both isoforms indicated that a large number of genes regulated on infection with SREBP-1a and/or -1c were not directly connected to lipid metabolism. Interestingly, the cellular func-

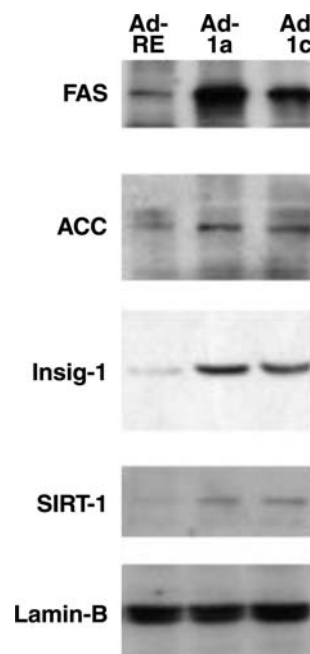


Fig. 5. Immunoblots of total cell lysates from human infected myotubes with adenoviruses expressing *Renilla* (Ad-RE), *Srebp-1a* (Ad-1a), and *Srebp-1c* (Ad-1c). Representative blots of 3 independent experiments are shown. Blots were probed with primary antibodies against fatty acid synthase (FAS), acetyl-CoA carboxylase (ACC), insulin induced gene-1 (Insig-1), and sirtuin-1 (SIRT-1). Lamin B1 is shown as a loading control.

Table 3A. Transcription factor matrixes displaying significant different frequencies in set of genes with a SRE motif in their promoter sequences (SREBP-1 direct target genes)

Transcription Factor Matrix	Genes Regulated by SREBP-1a/-1c			Matrix Name	Transcription Factors
	Genes with SRE Motif, %	Genes Without SRE Motif, %	z Scores		
V\$SREB	100	0	37.74	Sterol regulatory element binding proteins	SREBF1, SREBF2
V\$RXRF	100	95	6.66	RXR heterodimer binding sites	NR1H2, NR1H3, NR1I2, NR1I3, RARA, RARB, RARG, RXRA, RXRB, RARG, RXRG, THRA, THRB
V\$SP1F	99	92	6.57	GC-box factors SP1/GC	KLF10, KLF11, KLF13, KLF16, KLF5, KLF9, SP1, SP2, SP3, SP4, SP5, SP6, SP7, SP8
V\$EGRF	98	90	6.33	EGR/nerve growth factor induced protein C and related	EGR1, EGR2, EGR3, EGR4, WT1, ZBTB7A, ZBTB7B
V\$CREB	97	93	3.36	cAMP-responsive element binding proteins	ATF1, ATF2, ATF3, ATF4, ATF5, ATF6, ATF7, CREB1, CREB3, CREB3L3, CREB3L4, CREB5, CREBBP, CREM, NFIL3, XBP1
V\$E2FF	95	92	2.65	E2F-myc activator/cell cycle regulator	E2F1, E2F2, E2F3, E2F4, E2F5, E2F6, E2F7, E2F8, RB1, TFDP1, TFDP2, TFDP3
V\$EKLF	88	79	4.47	Basic and erythroid Krüppel-like factors	KLF1, KLF12, KLF15, KLF2, KLF3, KLF7, KLF8
V\$PAX5	79	69	4.24	PAX-5 B-cell-specific activator protein	PAX5
V\$AHRR	77	67	4.32	AHR-arnet heterodimers and AHR-related factors	AHR, NPAS4, SIM1, SIM2
V\$HESF	77	67	3.82	Vertebrate homologs of enhancer of split complex	BHLHB2, BHLHB3, HELT, HES1, HES2, HES3, HES4, HES5, HES6, HES7, HEY1, HEY2, ITGB3BP
V\$PLAG	70	62	3.05	Pleomorphic adenoma gene	PLAG1, PLAGL2
V\$GLIF	69	60	3.22	GLI zinc finger family	GLI1, GLI2, GLI3, GLIS1, GLIS2, ZIC1, ZIC2, ZIC3
V\$MOKF	68	62	2.35	Mouse Krüppel-like factor	ZNF239
V\$ZF5F	64	58	2.33	ZF5 POZ domain zinc finger	Zfp161
V\$P53F	63	57	2.41	p53 Tumor suppressor	TP53, TP73, TP73L
V\$RREB	63	55	2.85	Ras-responsive element binding protein	RREB1
V\$INSM	61	55	2.78	Interferon regulatory factors	INSM1
V\$HIF	59	49	3.51	Hypoxia-inducible factor, bHLH/PAS protein family	ARNT, ARNTL, ARNTL2, CLOCK, EPAS1, HIF1A, HIF3A, NPAS1, NPAS2
V\$WHNF	57	51	2.27	Winged helix binding sites	FOXP1, FOXP4
V\$NF1F	57	51	2.37	Nuclear factor 1	NF1A, NF1B, NF1C, NF1X
V\$CP2F	55	49	2.2	CP2-erythrocyte factor related to <i>Drosophila</i> E1f1	TFCP2, TFCP2L1, UBP1
V\$GCMF	54	48	2.17	Chorion-specific transcription factors with a GCM DNA	GCM1, GCM2
V\$HAML	47	41	1.99	Human acute myelogenous leukemia factors	CBFA2T2, CBFA2T3, CBF3, RUNX1, RUNX1T1, RUNX2, RUNX3
V\$ZNF	44	34	3.66	Zinc finger proteins	ZNF350, ZNF589
V\$HIC	43	37	2.12	Krüppel-like C2H2 zinc finger factors hypermethylated	HIC1, HIC2
V\$PURA	41	32	3.18	Pur-alpha binds both single-stranded and double-stranded	PURA
V\$ZF35	39	34	2.12	Zinc finger protein ZNF35	ZNF35
V\$PAX9	36	28	3.04	PAX-9 binding sites	PAX9
V\$SIX	14	1	9.06	Sine oculis (SIX) homeodomain factors	SIX3
V\$ARID	12	7	2.68	AT-rich interactive domain factor	ARID5B
V\$NRLF	11	4	4.67	Neural retina leucine zipper	NRL
V\$PAX4	9	2	6.13	Heterogeneous PAX-4 binding sites	PAX4

Promoter sequences (1,000 bp upstream of transcription start site) of the genes regulated by the overexpression of SREBP-1a and/or SREBP-1c in human myotubes were retrieved and scanned for transcription factor binding sites. A significant difference corresponded to a z score >1.96.

tions affected during the treatment were grossly similar to those described previously as being regulated by insulin in vivo in human skeletal muscle (41, 51). These data are in agreement with the concept that SREBP-1 is one of the key regulators of the transcriptional action of insulin in its target tissues (36). SREBP-1 has been described as a mediator of insulin action and increases the expression of several insulin-regulated target genes like FASN, ACC, and HK2 (15). Considering the insulin

signaling pathway, we confirmed in this study that SREBP-1 triggers an increase in PIK3R3 expression. Because this phosphatidylinositol 3-kinase regulatory p55  $\gamma$ -subunit was recently described as a direct target gene of SREBP-1c (23), it would be interesting to further examine whether SREBP-1 can also modulate the insulin signaling cascade.

In previous studies we have demonstrated (41, 42) a marked impact of insulin on the expression of genes of the ubiquitin-

Table 3B. *Transcription factor matrixes displaying significant different frequencies in set of genes without SRE motifs (SREBP-1 indirect target genes)*

Transcription Factor Matrix	Genes Regulated by SREBP-1a/-1c			Matrix Name	Transcription Factors
	Genes with SRE Motif, %	Genes Without SRE Motif, %	z Scores		
V\$NR2F	86	92	3.48	Nuclear receptor subfamily 2 factors	HNF4A, HNF4B, HNF4G, NR2C1, NR2C2, NR2E3, NR2F1, NR2F2, ZNF83
V\$MYBL	81	85	2.21	Cellular and viral myb-like transcriptional regulators	MYB, MYBL1, MYBL2
V\$HOXC	60	65	2.19	HOX-PBX complexes	HOXA1, HOXA10, HOXA2, HOXA3, HOXA4, HOXA5, HOXA6, HOXA7, HOXA9, HOXB1, HOXB2, HOXB3, HOXB4, HOXB5, HOXB6, HOXB7, HOXB8, HOXB9, HOXC10, HOXC4, HOXC5, HOXC6, HOXC8, HOXC9, HOXD1, HOXD10, HOXD3, HOXD4, HOXD8, HOXD9, PBX1, PBX2, PBX3
V\$APIR	59	64	4.65	MAF and AP1-related factors	NFE2L2, NFE2L3
V\$HNF1	47	55	2.92	Hepatic nuclear factor 1	TCF1, TCF2
V\$PBXC	47	54	2.34	PBX1-MEIS1 complexes	MEIS1, MEIS2, MEIS3, PBX1, PBX2, PBX3, PKNOX1, PKNOX2
V\$HNF6	43	50	2.41	Onecut homeodomain factor HNF6	ONECUT1, ONECUT2, ONECUT3, ONECUT3
V\$BARB	36	46	3.52	Barbiturate-inducible element box from pro- + eukaryotic	—
V\$LHXF	36	42	2.34	Lim homeodomain factors	LHX1, LHX3, LHX4, LMX1B
V\$CIZF	29	41	4.93	CAS interacting zinc finger protein	ZNF384
V\$CHRF	35	41	2.15	Cell cycle regulators: cell cycle homology element	—
V\$OCTP	33	41	2.75	OCT1 binding factor (POU-specific domain)	POU2F1, POU2F2, POU2F3
V\$PAX8	28	37	3.53	PAX-2/5/8 binding sites	PAX8
V\$BRAC	31	37	2.34	Brachyury gene, mesoderm developmental factor	EOMES, T, TBR1, TBX1, TBX10, TBX15, TBX18, TBX19, TBX2, TBX20, TBX21, TBX22, TBX23P, TBX3, TBX4, TBX5, TBX6
V\$PLZF	30	36	2.44	C2H2 zinc finger protein PLZF	ZBTB16, ZBTB32
V\$ATBF	27	34	2.79	AT-binding transcription factor	ATBF1
V\$ZFIA	24	32	3.13	Zinc finger with interaction domain factors	ZBTB6
V\$PIT1	14	29	6.3	GHF-1 pituitary specific pou domain transcription factor	POU1F1
V\$SATB	21	28	3.07	Special AT-rich sequence binding protein	SATB1, SATB2
V\$RP58	18	23	2.29	RP58 (ZFP238) zinc finger protein	ZNF238
V\$THAP	13	19	2.9	THAP domain containing protein	THAP1
V\$GCNR	7	14	4.14	Germ cell nuclear receptors	NR6A1

Promoter sequences (1,000 bp upstream of transcription start site) of the genes regulated by the overexpression of SREBP-1a and/or SREBP-1c in human myotubes were retrieved and scanned for transcription factor binding sites. A significant difference corresponded to a z score >1.96.

proteasome system (i.e., 7% of the 800 genes regulated by insulin in human skeletal muscle), but the microarray data obtained in this study indicated that this pathway is not particularly affected by the forced expression of either SREBP-1a or -1c in human myotubes. This suggests that the effect of insulin on the expression of the ubiquitin-proteasome system is not mediated by SREBP-1.

Because both SREBP-1 isoforms are master regulators of lipid metabolism, their overexpression would induce important changes in fatty acid synthesis, transport, and catabolism. In agreement with this, we found a marked impact of the overexpression of SREBP-1a and/or -1c on the regulation of 55 genes encoding mitochondrial proteins and proteins involved in mitochondrial respiration and oxidoreduction. The impor-

Table 4A. *Transcription factor matrixes displaying significantly different frequencies in the set of genes specifically regulated by SREBP-1a versus the genes regulated by both isoforms*

Transcription Factor Matrix	Genes Regulated by SREBP-1a, %	Genes Regulated by Both Isoforms, %	z Score	Matrix Name	Transcription Factors
V\$GZF1	32	23	2.05	GDNF-inducible zinc finger gene 1	ZNF336
V\$HEAT	79	71	2.02	Heat shock factors	HSF1, HSF2, HSF4, HSFY1, HSFY2

Promoter sequences (1,000 bp upstream of transcription start site) of the genes regulated by the overexpression of SREBP-1a or SREBP-1c in human myotubes were retrieved and scanned for transcription factor binding sites. A significant difference corresponded to a z score >1.96.



Table 4B. Transcription factor matrixes displaying significantly different frequencies in the set of genes specifically regulated by SREBP-1c versus the genes regulated by both isoforms

Transcription Factor Matrix	Genes Regulated by SREBP-1a, %	Genes Regulated by Both Isoforms, %	z Score	Matrix Name	Transcription Factors
V\$AIRE	30	15	2.69	Autoimmune regulatory element binding factor	AIRE
V\$APIF	52	36	2.22	AP1, Activating protein 1	BATF, FOS, FOSB, FOSL1, FOSL2, JDP2, JUN, JUNB, JUND, SNFT
V\$BARB	49	35	2.3	Barbiturate-inducible element	
V\$CAAT	90	79	2.03	CCAAT binding factors	CSDA, NFYA, NFYB, NFYC, UHRF1, YBX1
V\$FAST	48	32	2.19	FAST-1 SMAD interacting protein	FOXH1
V\$OCTP	42	28	2.08	Octamer-binding factor 1, POU-specific domain	POU2F1, POU2F2, POU2F3
V\$P53F	72	55	2.44	p53 Tumor suppressor	TP53, TP73, TP73L

Promoter sequences (1,000 bp upstream of transcription start site) of the genes regulated by the overexpression of SREBP-1a or SREBP-1c in human myotubes were retrieved and scanned for transcription factor binding sites. A significant difference corresponded to a z score >1.96.

tance of SREBP-1 in regulating mitochondrial function is supported by a recent study describing that in a human liver cell line (HepG2) overexpression of active SREBP-1a significantly modified the abundance of >100 mitochondrial proteins (27). More recently, it was demonstrated that SREBP-1 regulates the transcription of the mitochondrial citrate carrier (CIC), which exports citrate from the mitochondria to the cytosol (22). Interestingly, 30 genes among the 55 genes encoding mitochondrial proteins regulated in this study have SRE motifs in their promoter sequences. Altogether, these results suggest that SREBP-1a and -1c might be involved in the regulation of mitochondrial metabolism.

It seems likely that many of the observed mRNA changes were the result of nondirect effects of SREBP-1 overexpression, because only half of the 1,490 regulated genes had a DNA binding motif for SREBP in their promoter sequences. Gene ontology analysis indicated that the direct target genes of SREBP-1a and/or -1c (i.e., those promoters in which a SRE motif was identified) were significantly enriched in genes involved in the immune response. In support of this, it was demonstrated previously that changes in cholesterol levels modulated mediators of inflammation in endothelial cells and could be reversed when the level of SREBP was decreased (53). In other tissues such as the kidney (3, 37) or liver (25), increased levels of intracellular fatty acid and cholesterol triggered a proinflammatory situation. Our data indicate that SREBP-1 can be involved in the regulation of both the immune response and lipid and cholesterol metabolism pathways simultaneously.

SREBP transcription factors are known to induce expression of genes involved in cholesterol and fatty acid synthesis. Our microarray data and immunoblotting experiments confirmed that both of these pathways are activated by SREBP-1a and -1c. Interestingly, we also found 15 potential direct target genes for SREBP-1s involved in the carbohydrate metabolism. These potential SREBP-1 target genes are involved in membrane glucose transport, glycolysis, pentose phosphate pathway, and the pyruvate-citrate cycle. Furthermore, we have demonstrated that the overexpression of both SREBP isoforms leads to an increase of glucose oxidation rates as well as glycogen synthesis. Altogether, these results indicate that SREBP-1 not only mediates insulin action on glycogen storage but also triggers carbohydrate use to produce acetyl-coA and

NADPH, which are necessary for cholesterol and fatty acid synthesis.

It is recognized that SREBPs are weaker transcriptional activators in isolation than when they function in combination with coregulatory proteins. For example, synergistic activation of transcription by Sp1 and SREBP-1a has been described for the regulation of low-density lipoprotein receptor (54), ACC (34), and FAS (52) gene expression. In addition, the connections of the CCAAT-binding factor/nuclear factor-Y (CBF/NF-Y) with SREBP are interesting, because an increasing number of genes involved in cholesterol metabolism appear to be regulated by SREBPs through cooperation between SRE and NF-Y binding sites (4, 33, 46). In agreement, we have found putative SP1 and NF-Y binding motifs located near the SRE motif in the hexokinase 2 (HK2) promoter (16), which reinforced the idea that these three transcription factors may have cooperative effects. As expected from these previous studies, it appeared that all the genes with a SRE motif in their promoter sequences also had a DNA binding motif for members of the Sp1 family. However, we did not find significant enrichment for DNA motifs associated to CBF/NF-Y, indicating that in skeletal muscle the global transcription action of SREBP-1a/1c does not necessarily involve the cooperation between SREBP and NF-Y binding sites. Finally, 97% of the genes with a SRE motif had also DNA binding motifs for cAMP-responsive element (CRE)-binding proteins. Cooperation between SREBP and CRE-binding proteins has been demonstrated for the regulation of lanosterol 14 $\alpha$ -demethylase (CYP51) (18) and 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) synthase (11), both involved in the cholesterol biosynthesis pathway. In human skeletal muscle, the presence of a DNA motif for CRE-binding proteins in the neighborhood of SRE motifs is not restricted to the genes involved in the lipid pathway and might be necessary for the global transcriptional action of SREBP-1a and -1c in this tissue.

Besides these three TFs, we identified DNA motifs for TFs involved in the adaptative response to hypoxia. First described in *Schizosaccharomyces pombe*, in which homologs of SREBP-1 stimulated the transcription of genes required for adaptation to hypoxia (21), the relationship between SREBP and the response to hypoxia was further demonstrated in murine models. Intermittent hypoxia induces hyperlipidemia in the liver of lean (10, 30) and obese (28) mice, suggesting a link between hepatic

lipid metabolism and hypoxia. More recently, it was demonstrated that hyperlipidemia in response to hypoxia was mediated by SREBP-1 (29). In our study, half of the genes with a SRE motif also had DNA binding motifs for hypoxia-inducible factors. Our results indicate that, as in the liver, hypoxia and SREBP pathways are connected in human skeletal muscle.

The physiological relevance of the coexpression of both SREBP-1a and -1c in mammalian tissues is not clear. It has been postulated that because SREBP-1a interacts with coactivators and also activates gene expression more robustly than SREBP-1c, SREBP-1a would be expressed in tissues and conditions in which increased lipid synthesis is required and SREBP-1c would be preferentially expressed when low but regulated levels of lipid synthesis are important (48). Here we have shown that, as in other tissues, SREBP-1a and SREBP-1c isoforms differentially activated gene transcription (i.e., number of genes and fold changes). Unexpectedly, we also found that SREBP-1a and SREBP-1c have specific target genes in human muscle cells. To explain part of the molecular basis of this difference, we determined whether some DNA binding motifs for TFs were enriched in the promoter sequence of the gene regulated either by SREBP-1a or by SREBP-1c. Our data indicated that SRE motifs were statistically associated with DNA binding motifs for TFs involved in the immune response, in the promoter sequences of the genes specifically regulated by SREBP-1c. This function, already discussed as being one of the important functions of the target genes of SREBP-1 in human skeletal muscle, would be more dependent on the transcriptional action of SREBP-1c. Interestingly, the immune response was also one of the functional pathways described as regulated by insulin *in vivo* in human muscle (41, 51). Because in skeletal muscle insulin regulates SREBP-1c transcription, we can speculate that SREBP-1c would mediate the action of insulin on the regulation of genes involved in the immune signaling pathway.

We found that SRE motifs in the promoter sequences of the genes regulated specifically by SREBP-1a were statistically associated with DNA binding motifs for heat shock factors. A link between the heat shock response and the SREBP pathway was described recently in adipocytes overexpressing SREBP2 (40). In these cells, several genes encoding HSP proteins were upregulated. Heat shock proteins (Hsps) are molecular chaperones that aid in protein synthesis and trafficking and have been shown to protect cells/tissues from various protein-damaging stressors. In skeletal muscle, Hsps are upregulated during muscle hypertrophy (14, 31) or in aged skeletal muscle (31). In our study we found that four HSP proteins are specifically regulated by SREBP-1a. Furthermore, it has also been found that adipocytes overexpressing DnaJA4 (a HSP40/DnaJ protein family member) exhibited a specific increase in the rate of cholesterol synthesis. In our study, four proteins belonging to the same HSP40/DnaJ protein family were upregulated during the overexpression of SREBP-1a. These data suggested that at least part of the heat shock response could be mediated by SREBP-1a in human skeletal muscle.

Together, the results described in this study indicate that in human muscle cells SREBP-1a and -1c are involved in the regulation of a large number of genes that are at the crossroads of different functional pathways. Our *in silico* promoter analysis showed that different combinations of TFs that have binding sites around the SRE binding motifs may determine

regulatory networks of transcription that could explain the superposition of lipid and cholesterol metabolism with other various pathways involved in adaptive responses to stress like hypoxia and heat shock, or in the immune response.

#### ACKNOWLEDGMENTS

The authors acknowledge Jérémy Besson, Florine Jordano, and Erwin Guet for technical help in microarray data analysis, Corine Picat for cell culture, and Kevin Hogeveen for English corrections.

#### GRANTS

This work was supported in part by a research grant from the French National Program of Research on Diabetes (PNRD, ROSIH project).

#### REFERENCES

1. Bergman BC, Butterfield GE, Wolfel EE, Casazza GA, Lopaschuk GD, Brooks GA. Evaluation of exercise and training on muscle lipid metabolism. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 276: E106–E117, 1999.
2. Brown MS, Goldstein JL. The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. *Cell* 89: 331–340, 1997.
3. Buga GM, Frank JS, Mottino GA, Hakhamian A, Narasimha A, Watson AD, Yekta B, Navab M, Reddy ST, Anantharamaiah GM, Fogelman AM. D-4F reduces EO6 immunoreactivity, SREBP-1c mRNA levels, and renal inflammation in LDL receptor-null mice fed a Western diet. *J Lipid Res* 49: 192–205, 2008.
4. Cagen LM, Deng X, Wilcox HG, Park EA, Raghov R, Elam MB. Insulin activates the rat sterol-regulatory-element-binding protein 1c (SREBP-1c) promoter through the combinatorial actions of SREBP, LXR, Sp-1 and NF-Y *cis*-acting elements. *Biochem J* 385: 207–216, 2005.
5. Cartharius K, Frech K, Grote K, Klocke B, Haltmeier M, Klingenhoff A, Frisch M, Bayerlein M, Werner T. MatInspector and beyond: promoter analysis based on transcription factor binding sites. *Bioinformatics* 21: 2933–2942, 2005.
6. Chaussade C, Pirola L, Bonnafous S, Blondeau F, Brenz-Verca S, Tronchere H, Portis F, Rusconi S, Payrastra B, Laporte J, Van Obberghen E. Expression of myotubularin by an adenoviral vector demonstrates its function as a phosphatidylinositol 3-phosphate [PtdIns<sub>3</sub>P] phosphatase in muscle cell lines: involvement of PtdIns<sub>3</sub>P in insulin-stimulated glucose transport. *Mol Endocrinol* 17: 2448–2460, 2003.
7. Cozzone D, Debard C, Dif N, Ricard N, Disse E, Vouillarmet J, Rabasa-Lhoret R, Laville M, Pruneau D, Rieusset J, Lefai E, Vidal H. Activation of liver X receptors promotes lipid accumulation but does not alter insulin action in human skeletal muscle cells. *Diabetologia* 49: 990–999, 2006.
8. Dif N, Euthine V, Gonnet E, Laville M, Vidal H, Lefai E. Insulin activates human sterol-regulatory-element-binding protein-1c (SREBP-1c) promoter through SRE motifs. *Biochem J* 400: 179–188, 2006.
9. Diraison F, Motakis E, Parton LE, Nason GP, Leclerc I, Rutter GA. Impact of adenoviral transduction with SREBP-1c or AMPK on pancreatic islet gene expression profile: analysis with oligonucleotide microarrays. *Diabetes* 53, Suppl 3: S84–S91, 2004.
10. Dolt KS, Karar J, Mishra MK, Salim J, Kumar R, Grover SK, Qadar Pasha MA. Transcriptional downregulation of sterol metabolism genes in murine liver exposed to acute hypobaric hypoxia. *Biochem Biophys Res Commun* 354: 148–153, 2007.
11. Dooley KA, Bennett MK, Osborne TF. A critical role for cAMP response element-binding protein (CREB) as a co-activator in sterol-regulated transcription of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A synthase promoter. *J Biol Chem* 274: 5285–5291, 1999.
12. Ducluzeau PH, Perretti N, Laville M, Andreelli F, Vega N, Riou JP, Vidal H. Regulation by insulin of gene expression in human skeletal muscle and adipose tissue. Evidence for specific defects in type 2 diabetes. *Diabetes* 50: 1134–1142, 2001.
13. Foufelle F, Ferre P. New perspectives in the regulation of hepatic glycolytic and lipogenic genes by insulin and glucose: a role for the transcription factor sterol regulatory element binding protein-1c. *Biochem J* 366: 377–391, 2002.
14. Frier BC, Locke M. Heat stress inhibits skeletal muscle hypertrophy. *Cell Stress Chaperones* 12: 132–141, 2007.
15. Gosmain Y, Dif N, Berbe V, Loizon E, Rieusset J, Vidal H, Lefai E. Regulation of SREBP-1 expression and transcriptional action on HKII and

- FAS genes during fasting and refeeding in rat tissues. *J Lipid Res* 46: 697–705, 2005.
16. Gosmain Y, Lefai E, Ryser S, Roques M, Vidal H. Sterol regulatory element-binding protein-1 mediates the effect of insulin on hexokinase II gene expression in human muscle cells. *Diabetes* 53: 321–329, 2004.
  17. Guillet-Deniau I, Mieulet V, Le Lay S, Achouri Y, Carre D, Girard J, Foufelle F, Ferre P. Sterol regulatory element binding protein-1c expression and action in rat muscles: insulin-like effects on the control of glycolytic and lipogenic enzymes and UCP3 gene expression. *Diabetes* 51: 1722–1728, 2002.
  18. Halder SK, Fink M, Waterman MR, Rozman D. A cAMP-responsive element binding site is essential for sterol regulation of the human lanosterol 14 $\alpha$ -demethylase gene (CYP51). *Mol Endocrinol* 16: 1853–1863, 2002.
  19. Hegarty BD, Bobard A, Hainault I, Ferre P, Bossard P, Foufelle F. Distinct roles of insulin and liver X receptor in the induction and cleavage of sterol regulatory element-binding protein-1c. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 791–796, 2005.
  20. Horton JD, Shah NA, Warrington JA, Anderson NN, Park SW, Brown MS, Goldstein JL. Combined analysis of oligonucleotide microarray data from transgenic and knockout mice identifies direct SREBP target genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 12027–12032, 2003.
  21. Hughes AL, Todd BL, Espenshade PJ. SREBP pathway responds to sterols and functions as an oxygen sensor in fission yeast. *Cell* 120: 831–842, 2005.
  22. Infantino V, Iacobazzi V, De Santis F, Mastrapasqua M, Palmieri F. Transcription of the mitochondrial citrate carrier gene: role of SREBP-1, upregulation by insulin and downregulation by PUFA. *Biochem Biophys Res Commun* 356: 249–254, 2007.
  23. Kallin A, Johannessen LE, Cani PD, Marbehant CY, Essaghir A, Foufelle F, Ferre P, Heldin CH, Delzenne NM, Demoulin JB. SREBP-1 regulates the expression of heme oxygenase 1 and the phosphatidylinositol-3 kinase regulatory subunit p55 gamma. *J Lipid Res* 48: 1628–1636, 2007.
  24. Kim JB, Spotts GD, Halvorsen YD, Shih HM, Ellenberger T, Towle HC, Spiegelman BM. Dual DNA binding specificity of ADD1/SREBP-1 controlled by a single amino acid in the basic helix-loop-helix domain. *Mol Cell Biol* 15: 2582–2588, 1995.
  25. Kleemann R, Verschuren L, van Erk MJ, Nikolsky Y, Cnubben NH, Verheij ER, Smilde AK, Hendriks HF, Zadelaar S, Smith GJ, Kaznatcheev V, Nikolskaya T, Melnikov A, Hurt-Camejo E, van der Greef J, van Ommen B, Kooistra T. Atherosclerosis and liver inflammation induced by increased dietary cholesterol intake: a combined transcriptomics and metabolomics analysis. *Genome Biol* 8: R200, 2007.
  26. Le Brigand K, Russell R, Moreilhon C, Rouillard JM, Jost B, Amiot F, Magnone V, Bole-Feysot C, Rostagno P, Virolle V, Defamie V, Dessen P, Williams G, Lyons P, Rios G, Mari B, Gulari E, Kastner P, Gidrol X, Freeman TC, Barbry P. An open-access long oligonucleotide microarray resource for analysis of the human and mouse transcriptomes. *Nucleic Acids Res* 34: e87, 2006.
  27. Lehr S, Kotzka J, Avci H, Knebel B, Muller S, Hanisch FG, Jacob S, Haak C, Susanto F, Muller-Wieland D. Effect of sterol regulatory element binding protein-1a on the mitochondrial protein pattern in human liver cells detected by 2D-DIGE. *Biochemistry (Mosc)* 44: 5117–5128, 2005.
  28. Li J, Grigoryev DN, Ye SQ, Thorne L, Schwartz AR, Smith PL, O'Donnell CP, Polotsky VY. Chronic intermittent hypoxia upregulates genes of lipid biosynthesis in obese mice. *J Appl Physiol* 99: 1643–1648, 2005.
  29. Li J, Nanayakkara A, Jun J, Savransky V, Polotsky VY. Effect of deficiency in SREBP cleavage-activating protein on lipid metabolism during intermittent hypoxia. *Physiol Genomics* 31: 273–280, 2007.
  30. Li J, Thorne LN, Punjabi NM, Sun CK, Schwartz AR, Smith PL, Marino RL, Rodriguez A, Hubbard WC, O'Donnell CP, Polotsky VY. Intermittent hypoxia induces hyperlipidemia in lean mice. *Circ Res* 97: 698–706, 2005.
  31. Locke M. Heat shock transcription factor activation and hsp72 accumulation in aged skeletal muscle. *Cell Stress Chaperones* 5: 45–51, 2000.
  32. Malenfant P, Joannis DR, Theriault R, Goodpaster BH, Kelley DE, Simoneau JA. Fat content in individual muscle fibers of lean and obese subjects. *Int J Obes Relat Metab Disord* 25: 1316–1321, 2001.
  33. Murphy C, Ledmyr H, Ehrenborg E, Gafvels M. Promoter analysis of the murine squalene epoxidase gene. Identification of a 205 bp homing region regulated by both SREBP'S and NF-Y. *Biochim Biophys Acta* 1761: 1213–1227, 2006.
  34. Oh SY, Park SK, Kim JW, Ahn YH, Park SW, Kim KS. Acetyl-CoA carboxylase beta gene is regulated by sterol regulatory element-binding protein-1 in liver. *J Biol Chem* 278: 28410–28417, 2003.
  35. Orlando V, Strutt H, Paro R. Analysis of chromatin structure by in vivo formaldehyde cross-linking. *Methods* 11: 205–214, 1997.
  36. Osborne TF. Sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs): key regulators of nutritional homeostasis and insulin action. *J Biol Chem* 275: 32379–32382, 2000.
  37. Proctor G, Jiang T, Iwahashi M, Wang Z, Li J, Levi M. Regulation of renal fatty acid and cholesterol metabolism, inflammation, and fibrosis in Akita and OVE26 mice with type 1 diabetes. *Diabetes* 55: 2502–2509, 2006.
  38. Rasmussen BB, Holmback UC, Volpi E, Morio-Liondore B, Paddon-Jones D, Wolfe RR. Malonyl coenzyme A and the regulation of functional carnitine palmitoyltransferase-1 activity and fat oxidation in human skeletal muscle. *J Clin Invest* 110: 1687–1693, 2002.
  39. Rieusset J, Bouzakri K, Chevillotte E, Ricard N, Jacquet D, Bastard JP, Laville M, Vidal H. Suppressor of cytokine signaling 3 expression and insulin resistance in skeletal muscle of obese and type 2 diabetic patients. *Diabetes* 53: 2232–2241, 2004.
  40. Robichon C, Varret M, Le Liepvre X, Lasnier F, Hajdouch E, Ferre P, Dugail I. DnaJA4 is a SREBP-regulated chaperone involved in the cholesterol biosynthesis pathway. *Biochim Biophys Acta* 1761: 1107–1113, 2006.
  41. Rome S, Clement K, Rabasa-Lhoret R, Loizon E, Poitou C, Barsh GS, Riou JP, Laville M, Vidal H. Microarray profiling of human skeletal muscle reveals that insulin regulates approximately 800 genes during a hyperinsulinemic clamp. *J Biol Chem* 278: 18063–18068, 2003.
  42. Rome S, Meugnier E, Vidal H. The ubiquitin-proteasome pathway is a new partner for the control of insulin signaling. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 7: 249–254, 2004.
  43. Shimano H. Sterol regulatory element-binding protein family as global regulators of lipid synthetic genes in energy metabolism. *Vitam Horm* 65: 167–194, 2002.
  44. Shimomura I, Shimano H, Horton JD, Goldstein JL, Brown MS. Differential expression of exons 1a and 1c in mRNAs for sterol regulatory element binding protein-1 in human and mouse organs and cultured cells. *J Clin Invest* 99: 838–845, 1997.
  45. Starling RD, Trappe TA, Parcell AC, Kerr CG, Fink WJ, Costill DL. Effects of diet on muscle triglyceride and endurance performance. *J Appl Physiol* 82: 1185–1189, 1997.
  46. Teran-Garcia M, Adamson AW, Yu G, Rufo C, Suchankova G, Dreesen TD, Tekle M, Clarke SD, Gettys TW. Polyunsaturated fatty acid suppression of fatty acid synthase (FASN): evidence for dietary modulation of NF-Y binding to the Fasn promoter by SREBP-1c. *Biochem J* 402: 591–600, 2007.
  47. Tontonoz P, Kim JB, Graves RA, Spiegelman BM. ADD1: a novel helix-loop-helix transcription factor associated with adipocyte determination and differentiation. *Mol Cell Biol* 13: 4753–4759, 1993.
  48. Toth JJ, Datta S, Athanikar JN, Freedman LP, Osborne TF. Selective coactivator interactions in gene activation by SREBP-1a and -1c. *Mol Cell Biol* 24: 8288–8300, 2004.
  49. Tusher VG, Tibshirani R, Chu G. Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 5116–5121, 2001.
  50. Vallett SM, Sanchez HB, Rosenfeld JM, Osborne TF. A direct role for sterol regulatory element binding protein in activation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase gene. *J Biol Chem* 271: 12247–12253, 1996.
  51. Wu X, Wang J, Cui X, Maianu L, Rhee B, Rosinski J, So WV, Willi SM, Osier MV, Hill HS, Page GP, Allison DB, Martin M, Garvey WT. The effect of insulin on expression of genes and biochemical pathways in human skeletal muscle. *Endocrine* 31: 5–17, 2007.
  52. Xiong S, Chirala SS, Wakil SJ. Sterol regulation of human fatty acid synthase promoter I requires nuclear factor-Y- and Sp-1-binding sites. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 3948–3953, 2000.
  53. Yeh M, Cole AL, Choi J, Liu Y, Tulchinsky D, Qiao JH, Fishbein MC, Dooley AN, Hovnanian T, Mouilleseaux K, Vora DK, Yang WP, Gargalovic P, Kirchgessner T, Shyy JY, Berliner JA. Role for sterol regulatory element-binding protein in activation of endothelial cells by phospholipid oxidation products. *Circ Res* 95: 780–788, 2004.
  54. Yieh L, Sanchez HB, Osborne TF. Domains of transcription factor Sp1 required for synergistic activation with sterol regulatory element binding protein 1 of low density lipoprotein receptor promoter. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 6102–6106, 1995.



## Discussion

Grâce à ce travail, basé sur l'utilisation de puces à ADN pangénomiques combinée à la surexpression des formes matures de SREBP-1a et SREBP-1c, nous avons déterminé pour la première fois l'ensemble des gènes cibles de SREBP-1 dans des cellules musculaires humaines. Nous avons également analysé le rôle spécifique de chacune des isoformes SREBP-1a et SREBP-1c individuellement, afin de discriminer les gènes cibles de l'un et de l'autre, et monter ainsi leur éventuelle implication dans des fonctions cellulaires différentes.

Nous montrons ici que la surexpression de SREBP-1a module au totale l'expression de 1300 gènes alors que la surexpression de SREBP-1c ne modifie l'expression que de 500 gènes. Il existe quelques gènes spécifiquement régulés par l'une ou l'autre isoforme. Cette spécificité d'action de SREBP-1a ou SREBP-1c pourrait s'expliquer par le recrutement de cofacteurs spécifiques au niveau de certains gènes. Ainsi, les promoteurs des gènes cibles de SREBP-1c présentent un enrichissement en motifs de liaison à des facteurs de transcription impliqués dans la réponse immune. La réponse immune est d'ailleurs une des fonctions altérée par la surexpression de SREBP-1 dans le muscle squelettique. Cette même fonction est également régulée par l'insuline, *in vivo*, dans le muscle squelettique humain. SREBP-1c serait donc le médiateur des effets de l'insuline sur l'expression des gènes régulant la réponse immune.

Au contraire, les promoteurs des gènes régulés par SREBP-1a sont enrichis en motifs de liaison aux facteurs HSF, Heat Shock Factors. Les HSF sont des facteurs de transcription régulant l'expression des HSP, Heat Shock Proteins, protéines chaperonnes impliquées dans de nombreuses réponses au stress cellulaire, notamment le choc thermique. Dans le muscle squelettique, elles sont activées lors de l'hypertrophie et au cours du vieillissement. Quatre HSP sont, d'ailleurs, spécifiquement régulées par SREBP-1a.

La comparaison des listes de gènes régulés par chacune des isoformes montre cependant que la quasi-totalité des gènes régulés par SREBP-1c l'est aussi par SREBP-1a. Ces deux isoformes ont donc une action redondante dans les cellules musculaires.

Notre analyse a montré que la majorité des gènes sont régulés de la même façon par SREBP-1 et SREBP-1c, mais avec des intensités différentes. En effet, la réponse transcriptionnelle à SREBP-1a est significativement plus forte que la réponse à SREBP-1c. SREBP-1a est considéré comme un activateur transcriptionnel plus puissant que SREBP-1c,



car son domaine de transactivation plus long lui permet une meilleure interaction avec les cofacteurs.

Comme précédemment observé dans des analyses transcriptomiques de foie de souris surexprimant SREBP-1a ou SREBP-2, dans des îlots pancréatiques isolés transfectés par SREBP-1c ou dans des fibroblastes transfectés par SREBP-1a, nos résultats montrent que SREBP-1a et/ou SREBP-1c régulent l'expression d'un très grand nombre de gènes dans les cellules musculaires humaines. En effet, près de 1500 gènes voient leur expression varier significativement en réponse à la surexpression de SREBP-1a et/ou SREBP-1c. L'analyse fonctionnelle de ces gènes révèle que beaucoup ne sont pas liés directement au métabolisme des lipides. Parmi les fonctions cellulaires affectées par SREBP-1a et/ou SREBP-1c, nombreuses sont celles également régulées *in vivo* par l'insuline dans le muscle squelettique humain, comme le montre une étude menée au sein du laboratoire (Rome *et al.* 2003). Ces données sont accord avec le rôle déjà défini pour SREBP-1 de médiateur des effets transcriptionnels de l'insuline. Il stimule notamment l'expression des gènes cibles de l'insuline *FAS*, *ACC* et *HKII*, enzymes clés de la lipogenèse et de la glycolyse.

Les facteurs de transcription SREBP-1, en tant qu'acteurs majeurs du maintien de l'homéostasie lipidique, régulent bien-sûr l'expression de nombreuses enzymes impliquées dans la synthèse des acides gras et du cholestérol. L'analyse des données de puces ADN et des western-blots réalisés sur les cellules musculaires surexprimant SREBP-1 confirment que ces deux voies de synthèse sont activées à la fois par SREBP-1a et par SREBP-1c. SREBP-1 étant fondamentalement impliqué dans le métabolisme des lipides, sa surexpression module la synthèse des acides gras mais aussi leur transport et leur oxydation, fonctions réalisées en partie au niveau mitochondriale. La surexpression de SREBP-1a et/ou de SREBP-1c régule 55 gènes codant pour des protéines mitochondriales, impliquées dans la respiration et l'oxydoréduction mitochondriale. Parmi ces 55 gènes, 30 contiennent un site SRE au niveau de leur promoteur et sont donc potentiellement des cibles directes de SREBP-1. L'importance de l'influence de SREBP-1 dans la régulation des fonctions mitochondriales est également mise en valeur par une étude montrant que la surexpression de SREBP-1a dans des cellules hépatiques HEPG2 modifie significativement l'expression de plus de 100 protéines mitochondriales (Lehr *et al.* 2005) .

En outre, nos résultats mettent en évidence 15 gènes cibles potentiels de SREBP-1 impliqués dans le métabolisme des carbohydrates. Ces gènes sont impliqués plus

particulièrement dans le transport du glucose, la glycolyse, le cycle des pentoses-phosphate et le cycle de Krebs. De plus, la surexpression de SREBP-1 induit une augmentation de l'oxydation du glucose et de la synthèse du glycogène. Ces résultats confirment que SREBP-1 est un régulateur clé, dans le muscle squelettique comme dans le foie, du métabolisme lipidique mais qu'il participe aussi à la régulation du métabolisme des carbohydrates musculaires. SREBP-1 apparaît donc comme un médiateur des effets de l'insuline dans le muscle squelettique non seulement sur le métabolisme des lipides mais également sur le métabolisme glucidique.

Nos résultats montrent donc que SREBP-1a et SREBP-1c régulent dans le muscle squelettique de nombreux gènes impliqués dans les fonctions métaboliques. Cependant ces gènes ne représentent que 6 % de l'ensemble des gènes régulés par SREBP-1 dans les myotubes humains. L'étude fonctionnelle de ces gènes révèle l'implication des facteurs SREBP-1 dans des fonctions aussi diverses que la signalisation intracellulaire (10% des gènes régulés), la régulation du cytosquelette et du trafic des vésicules intracellulaires (7%), l'expression des récepteurs et transporteurs cellulaires (5%), la réponse immune et l'inflammation (3%), la régulation du cycle cellulaire et la prolifération (3%), l'apoptose (2%). De plus, 6% des gènes régulés par SREBP-1 sont des gènes spécifiques du muscle, suggérant la possibilité d'un rôle spécifiquement musculaire pour ces deux facteurs. SREBP-1 pourrait donc être impliqué directement dans la régulation du phénotype musculaire.

L'analyse des séquences promotrices des gènes cibles de SREBP-1 mis en évidence dans cette étude révèle que la moitié des gènes dont l'expression est modulée par la surexpression de SREBP-1 ne contient pas de site SRE. Leur régulation par SREBP-1 est donc indirecte et passe par l'activation d'autres facteurs de transcription par SREBP-1. En fait, la majorité des gènes régulés par SREBP-1 (20%) sont impliqués dans les régulations transcriptionnelle et traductionnelle. 110 gènes régulés par SREBP-1a ou SREBP-1c codent pour un facteur de transcription. Les facteurs SREBP-1 sont donc eux-mêmes à l'origine de l'activation d'un vaste réseau de régulation transcriptionnelle dans le muscle squelettique.

Les facteurs de transcription SREBP sont de faibles activateurs transcriptionnels par eux-mêmes et doivent donc agir en synergie avec des co-régulateurs pour activer la transcription de leurs gènes cibles. SREBP-1a interagit notamment avec le co-activateur Sp1 pour réguler les gènes codant pour la FAS, ACC et le récepteur au LDL. La régulation par

SREBP de nombreux gènes du métabolisme du cholestérol nécessite la coopération entre un site SRE et un site NFY, site reconnu par le co-activateur CBF/NFY. De plus, notre équipe de recherche a montré la présence de sites de liaison à Sp1 et NFY sur le promoteur de l'enzyme HKII. En accord avec ces précédentes observations, nous montrons que tous les gènes cibles de SREBP-1 porteurs d'un site SRE sur leur promoteur contiennent également un site de liaison à Sp1. Par contre, nous ne notons pas d'enrichissement significatif du site de liaison à NFY ; la coopération avec NFY n'est donc pas nécessaire à l'activité transcriptionnelle globale de SREBP-1a/1c dans le muscle squelettique. Enfin, 97% des gènes porteurs d'un motif SRE présentent également un site CRE, cAMP response element, site de liaison du facteur CREB. La coopération entre CREB et SREBP permet la régulation de l'expression de la HMG-CoA, impliquée dans la synthèse du cholestérol. Dans le muscle humain, la présence de site CRE au voisinage de site SRE n'est pas restreinte aux gènes du métabolisme du cholestérol mais pourrait être nécessaire à l'activité transcriptionnelle de SREBP de façon générale.

En plus de ces trois co-activateurs bien connus pour interagir avec SREBP, l'analyse des promoteurs de gènes cibles de SREBP met en évidence la présence sur certains de ces promoteurs d'éléments de motifs de liaison à des facteurs de transcription impliqués dans la réponse cellulaire à l'hypoxie. La relation entre SREBP et la réponse à l'hypoxie a été d'abord mise en évidence dans la levure *Schizosaccharomyces pombe*, où les homologues de SREBP-1 stimulent l'expression des gènes permettant l'adaptation à l'hypoxie. Chez la souris, mince ou obèse, l'activation de SREBP-1 en réponse à l'hypoxie induit une hyperlipidémie et une surcharge lipidique dans le foie. Dans notre étude, la moitié des gènes avec un site SRE possède un site de liaison pour les facteurs induits par l'hypoxie, HIF. Ainsi dans le muscle squelettique comme dans le foie, la réponse à l'hypoxie est liée à l'activité transcriptionnelle de SREBP.

L'ensemble des résultats décrits dans cette étude montre que les facteurs de transcription SREBP-1a et SREBP-1c régulent l'expression d'un grand nombre de gènes impliqués dans de très diverses fonctions cellulaires, leur rôle dans le muscle squelettique ne se réduisant pas au simple contrôle du métabolisme lipidique. Leur implication à la fois dans la réponse à l'hypoxie, dans la réponse immunitaire, l'inflammation et la réponse au choc thermique indique également un rôle pour les facteurs SREBP-1 dans la réponse au stress extracellulaire. De plus, la régulation d'un grand nombre de gènes muscle-spécifiques par SREBP-1a et SREBP-1c suggère qu'ils pourraient remplir une fonction spécifiquement musculaire et jouer un rôle dans le contrôle du phénotype musculaire.



## Article n° 2

**Un nouveau rôle pour les facteurs de transcription SREBP-1 dans le contrôle de la masse musculaire et la différenciation des cellules musculaires.**

A new role for SREBP-1 transcription factors in the regulation of muscle mass and muscle cell differentiation. (Submit to *Mol. Cell Biol.* )

*Virginie Lecomte, Emmanuelle Meugnier, Vanessa Euthine, Damien Freyssenet, Georges Nemoz, Sophie Rome, Hubert Vidal et Etienne Lefai.*



## Introduction

Afin de mieux caractériser le rôle de SREBP-1 dans le muscle squelettique, nous avons identifiés ses gènes cibles potentiels grâce à l'analyse transcriptomique de myotubes humains surexprimant SREBP-1a et SREBP-1c (article n°1) (Rome *et al.* 2008). De plus, nous avons montré que les facteurs SREBP-1 régulent l'expression de plusieurs gènes muscle-spécifiques, indiquant l'implication de SREBP-1 dans une fonction spécifiquement musculaire. De façon inattendue, nous observons une diminution drastique de l'expression de ces gènes muscle-spécifiques et de certains marqueurs de la différenciation musculaire dans les cellules surexprimant SREBP-1. Ces résultats nous ont conduits à considérer le rôle de SREBP-1a et SREBP-1c dans la régulation de la myogenèse et du développement musculaire.

Les stades précoces du développement musculaire embryonnaire sont régis par l'activité de facteurs bHLH spécifiques du muscle et facteurs régulateurs de la myogenèse, MRF : MyoD, Myf5, MRF4 et myogénine (Buckingham 2001). Ces facteurs sont également impliqués dans l'activation et la différenciation des cellules satellites au cours de la régénération musculaire ainsi que dans la détermination et le maintien du phénotype des fibres musculaires (Buckingham and Montarras 2008; Favier *et al.* 2008). Ils contrôlent l'expression de la plupart des gènes muscle-spécifiques en régulant directement leur activité promotrice (Bryson-Richardson and Currie 2008).

Il a été récemment décrit qu'un autre facteur de la super-famille des bHLH, le répresseur transcriptionnel BHLHB3 inhibe la différenciation de cellules musculaires C2C12 en bloquant l'action de MyoD (Azmi *et al.* 2004). BHLHB3 possède une forte homologie avec un deuxième répresseur transcriptionnel, BHLHB2. Tout deux répriment l'expression de leur gènes cibles soit directement en se fixant au niveau de motifs E-Box, soit en interagissant avec d'autres facteurs de transcription dont ils inhibent l'activité. BHLHB2 et BHLHB3 sont largement exprimés des stades embryonnaires à l'âge adulte ; leur expression est régulée de façon spécifique en fonction du type cellulaire au cours de divers processus biologiques comme l'hypoxie, la croissance et la différenciation cellulaire, la régulation du rythme circadien. Leur implication dans la régulation du développement au cours de l'embryogenèse est très étudiée et montre qu'ils contrôlent plusieurs processus de différenciation cellulaire (Yamada and Miyamoto 2005).

En continuité avec les travaux précédents, nous avons cherché à élucider le rôle des facteurs SREBP-1 dans la fonction musculaire. Après avoir confirmé les données de



transcriptomique obtenues précédemment (article n°1), nous nous sommes attachés à mettre en évidence les conséquences de l'inhibition des gènes muscle-spécifiques, notamment des MRF, au cours de la surexpression de SREBP-1a et SREBP-1c sur le phénotype de myoblastes et myotubes humains en culture primaire, caractérisé par immunofluorescence. Nous avons ensuite testé *in vivo* l'effet de la surexpression des deux isoformes de SREBP-1 sur le muscle squelettique de souris, par injection intramusculaire d'adénovirus codant à la fois pour les formes matures de SREBP-1a et SREBP-1c et la protéine fluorescente GFP.

Enfin, nous avons tenté de déterminer l'implication des répresseurs transcriptionnels BHLHB2 et BHLHB3 dans l'inhibition par SREBP-1 des gènes muscle-spécifiques ; d'une part en étudiant les promoteurs des gènes *BHLHB2* et *BHLHB3* et leur activation en réponse à SREBP-1 ; d'autre part, par analyse transcriptomique et caractérisation du phénotype de myotubes humains surexprimant BHLHB2 et BHLHB3, après construction des adénovirus recombinants correspondants ; enfin, en étudiant l'impact de l'inhibition par ARN interférence de BHLHB2 et BHLHB3 sur l'effet de SREBP-1 dans les cellules musculaires humaines différenciées ou non .

# A New Role for Sterol Regulatory Element Binding Protein 1 Transcription Factors in the Regulation of Muscle Mass and Muscle Cell Differentiation<sup>∇</sup>

Virginie Lecomte,<sup>1,2,3,4,5</sup> Emmanuelle Meugnier,<sup>1,2,3,4,5</sup> Vanessa Euthine,<sup>1,2,3,4,5</sup> Christine Durand,<sup>1,2,3,4,5</sup>  
Damien Freyssenet,<sup>6</sup> Georges Nemoz,<sup>1,2,3,4,5</sup> Sophie Rome,<sup>1,2,3,4,5</sup>  
Hubert Vidal,<sup>1,2,3,4,5</sup> and Etienne Lefai<sup>1,2,3,4,5\*</sup>

INSERM, U870, F-69921 Oullins Cedex, France<sup>1</sup>; INRA, UMR1235, F-69921 Oullins, France<sup>2</sup>; INSA-Lyon, RMND, F-69621 Villeurbanne, France<sup>3</sup>; Université Lyon 1, Faculté de Médecine Lyon-Sud, F-69600 Oullins, France<sup>4</sup>; Hospices Civils de Lyon (Service de Diabétologie et Nutrition), F-69008 Lyon, France<sup>5</sup>; and EA4338, Université Jean Monnet, F-42023 Saint-Etienne, France<sup>6</sup>

Received 28 May 2009/Returned for modification 7 July 2009/Accepted 1 December 2009

**The role of the transcription factors sterol regulatory element binding protein 1a (SREBP-1a) and SREBP-1c in the regulation of cholesterol and fatty acid metabolism has been well studied; however, little is known about their specific function in muscle. In the present study, analysis of recent microarray data from muscle cells overexpressing SREBP1 suggested that they may play a role in the regulation of myogenesis. We then demonstrated that SREBP-1a and -1c inhibit myoblast-to-myotube differentiation and also induce *in vivo* and *in vitro* muscle atrophy. Furthermore, we have identified the transcriptional repressors BHLHB2 and BHLHB3 as mediators of these effects of SREBP-1a and -1c in muscle. Both repressors are SREBP-1 target genes, and they affect the expression of numerous genes involved in the myogenic program. Our findings identify a new role for SREBP-1 transcription factors in muscle, thus linking the control of muscle mass to metabolic pathways.**

The sterol regulatory element binding protein (SREBP) transcription factors belong to the basic helix-loop-helix (bHLH) leucine zipper family of DNA-binding proteins. The three isoforms identified thus far in mammalian tissues are coded by two distinct genes, *Srebf1* and *Srebf2*, and vary in structure, regulation, and functions (14). SREBP-1a and SREBP-1c proteins are produced by alternative promoter usage of the *SREBF1* gene and are key actors of the regulation of genes related to lipid metabolism, especially those involved in lipogenesis and triglyceride deposition. In contrast, SREBP-2 has been more closely associated with cholesterol synthesis and accumulation (20, 52).

In agreement with these known functions, the SREBP-1 proteins are strongly expressed in tissues with high lipogenic capacities, such as liver and adipose tissues. However, significant expression has been also reported in skeletal muscle, both *in vivo* and *in vitro*, in cultured muscle cells (12, 13, 18). In muscle, SREBP-1 expression is induced by activation of the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt and the mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways by insulin and growth factors (6, 12, 18, 28, 38), suggesting additional functions of these transcription factors in a tissue with a low rate of lipid synthesis. Using microarray analysis to characterize the role of SREBP-1a and -1c in skeletal muscle, we have recently identified some of their potential target genes in primary cultures of human myotubes overexpressing SREBP-1a or SREBP-1c

(43). In the present study, we found that SREBP-1a and -1c regulate more than 1,000 genes, indicating that they are potentially involved in the regulation of a large variety of biological functions in muscle cells. Quite unexpectedly, we observed a dramatic reduction in the expression of a number of muscle-specific genes and markers of muscle differentiation in cells overexpressing SREBP-1 proteins. This led us to investigate their potential role in the regulation of myogenesis and muscle development.

The early stages of muscle development are regulated by muscle-specific bHLH transcription factors (e.g., MYF5, MYOD1, MYOG [myogenin], and MYF6 [MRF4]), which are also involved in the differentiation of satellite cells during the regeneration process in adult muscle. Recently, the transcriptional factor BHLHB3 was shown to inhibit *in vitro* muscle cell differentiation by interacting with MYOD1 (2). BHLHB3 (also named DEC1/SHARP1) is a transcriptional repressor closely related (97% homology in amino acid sequence in the bHLH domain) to BHLHB2 (also named Stra13/DEC2/SHARP2). They both repress the expression of target genes by binding to E-Box sequences, as well as through protein-protein interactions with other transcription factors (reviewed in reference 51). BHLHB2 and BHLHB3 genes are widely expressed in both embryonic and adult tissues and their expression is regulated in cell type-specific manner in various biological processes, including circadian rhythms (19), hypoxia (35), or cellular differentiation (7). Their involvement in the regulation of developmental processes during embryogenesis has been largely studied (4, 7, 24, 34, 44). We demonstrate here that BHLHB2 and BHLHB3 mediate negative effects of SREBP-1 transcription factors on myogenesis, acting at both the myo-

\* Corresponding author. Mailing address: UMR 1235 INRA 870 INSERM, Faculté de Médecine Lyon Sud, BP 12, 69921 Oullins Cedex, France. Phone: 33 (0) 4 26 23 59 48. Fax: 33 (0) 4 26 23 59 16. E-mail: lefai@univ-lyon1.fr.

<sup>∇</sup> Published ahead of print on 22 December 2009.

blast and the myotube stages. The SREBP-1-mediated effects on BHLHB2 and BHLHB3 activity thus defines a novel negative regulation pathway in skeletal muscle cell development.

#### MATERIALS AND METHODS

**Culture of human skeletal muscle cells.** Muscle biopsies were taken from healthy lean subjects during surgical procedure, with the approval of the Ethics Committee of Lyon Hospitals. Myoblasts were purified, and differentiated myotubes were prepared according to a procedure previously described in detail (11).

**Expression vectors and generation of recombinant adenoviruses.** For the construction of expression vector encoding BHLHB2, a verified sequence IMAGE clone (cloneID 4860809) was purchased from Geneservice (Cambridge, United Kingdom) and subcloned into the pcDNA 3.1 expression vector (Invitrogen). The expression vector encoding BHLHB3 was generated by PCR amplification and ligated into pCDNA3.1. Expression vector encoding the dominant-negative form of SREBP-1 (ADD1-DN) is a generous gift of B. Spiegelman (Dana-Farber Cancer Institute/Harvard Medical School, Boston, MA) (27). Recombinant adenoviral genomes carrying the human BHLHB2 or BHLHB3 or ADD1-DN were generated by homologous recombination in the VmAdcDNA3 plasmid (a gift from S. Rusconi, Fribourg, Switzerland) and amplified as described previously (9, 12).

Construction of expression vectors encoding mature nuclear forms of human SREBP-1a (named pCMV-hSREBP1a) and SREBP-1c (named pCMV-hSREBP1c) was described previously (12). A fragment of the pIRES plasmid (Clontech, Mountain View, CA) containing the internal ribosome entry site (IRES) and enhanced green fluorescent protein (EGFP) sequence was cloned into pCMV-hSREBP1a and pCMV-hSREBP1c to obtain pCMV-hSREBP1a-IRES-GFP and pCMV-hSREBP1c-IRES-GFP. Recombinant adenoviruses expressing simultaneously nuclear forms of either SREBP-1a or SREBP-1c and GFP as a marker were generated by homologous recombination in the VmAdcDNA3 plasmid and amplified.

**Overexpression of human SREBP-1a, SREBP-1c, BHLHB2, or BHLHB3 in human muscle cells.** The construction of recombinant adenoviruses encoding nuclear SREBP-1a and SREBP-1c was described previously (12). Human muscle cells were infected as myoblasts or myotubes. Myoblasts were grown in six-well plates. Myoblasts at 70% confluence or myotubes after 5 days of differentiation were infected for 48 h with the recombinant adenovirus encoding BHLHB2 or BHLHB3 or nuclear forms of SREBP-1a or SREBP-1c or GFP as a control.

**Inhibition of BHLHB2 and BHLHB3 expression in human muscle cells.** Inhibition of BHLHB2 and BHLHB3 expression was performed by RNA interference using small interfering RNA (siRNA) against BHLHB2 and against BHLHB3 (Qiagen). A rhodamine labeled GFP-22 siRNA was used as control. Myoblasts at 70% confluence were transfected with siRNAs using the Hiperfect transfection reagent (Qiagen, Courtabouef, France) according to the manufacturer's protocol.

**In vivo overexpression of human SREBP-1a, SREBP-1c, BHLHB2, and BHLHB3 in mice tibialis anterior muscles.** All animal procedures were conducted according to the national guidelines for the care and use of laboratory animals. Adult (12- to 14-week-old) BALB/c male mice (Harlan, France) were subjected to adenoviral delivery according to the procedure described by Sapru et al. (45). Briefly, right tibialis anterior muscles of mice were injected with  $10^{10}$  infectious units of recombinant adenovirus expressing either SREBP-1a/GFP, SREBP-1c/GFP, BHLHB2, or BHLHB3. As a control, the contralateral tibialis anterior muscles were also injected with  $10^{10}$  infectious units of recombinant adenovirus expressing GFP. Mice were sacrificed 7 days after injection. The tibialis anterior muscle was removed and immediately snap-frozen in liquid nitrogen. Sections (10  $\mu$ m) were cut, and every tenth section was collected onto glass slides for examination under fluorescence illumination using an Axiovert 200 microscope, an AxioCam MRm camera, and Axiovision 4.1 image acquisition software (Carl Zeiss, Göttingen, Germany). Muscle fiber sizes and fluorescence intensities were measured by using NIH ImageJ software.

**Protein expression analysis by immunocytofluorescence.** Cells were fixed in 10% formaldehyde and permeabilized with 0.1% Triton X-100. Nonspecific binding sites were blocked with 1% bovine serum albumin in  $1\times$  phosphate-buffered saline for 1 h at room temperature. Cells were then incubated overnight at 4°C with specific primary antibodies (anti-TNNI1, C-19; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA; antimyogenin, F5D; Developmental Studies Hybridoma Bank, University of Iowa, Iowa City, IA). Detection was achieved by using Alexa 555-conjugated donkey anti-goat and goat anti-mouse IgG (Molecular Probes/Invitrogen).

Cells were mounted with Vectashield with DAPI Fluorep mounting medium

(H1200; Vector Laboratories, Peterborough, England) and examined by fluorescence microscopy using an Axiovert 200 microscope, an AxioCam MRm camera, and Axiovision 4.1 image acquisition software. The area of TNNI1 immunostained differentiated myotubes was measured by using NIH ImageJ software.

**Protein expression analysis by Western blotting.** Classical Western blot experiments were performed as described previously (12). After transfer, gels were stained with Coomassie blue. Membranes were then incubated overnight at 4°C with the following specific primary antibodies: anti-SREBP-1 (H160), anti-MYOD1 (M316), anti-MEF2C (E17), anti-MYOG (M225), anti-TNNI1 (C-19), and anti-TNNI2 (C-19) from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA); anti-BHLHB2 (M01; 5B1); and anti-BHLHB3 (M01; 4H6) from Abnova (Taipei, Taiwan).

The signal was detected by using a horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody and revealed with the enhanced chemiluminescence system (Pierce, Rockford, IL). Signal was quantified by using NIH ImageJ software. The intensity of Coomassie blue staining was used to normalize the total amount of proteins.

**Quantification of mRNAs by real-time RT-PCR.** Total RNA was isolated by using the TRIzol reagent (Invitrogen, Courtabouef, France) according to the manufacturer's instructions. First-strand cDNAs were synthesized from 500 ng of total RNAs in the presence of 100 U of Superscript II (Invitrogen) and a mixture of random hexamers and oligo(dT) primers (Promega). Real-time PCR assays were performed with Rotor-Gene 6000 (Corbett Research, Mortlake, Australia). A list of the primers and real-time PCR assay conditions are available from the authors upon request. The results were normalized by using RPLP0 or HPRT (hypoxanthine phosphoribosyltransferase) mRNA concentration, measured as reference gene in each sample.

**ChIP assay.** The chromatin immunoprecipitation (ChIP) experiments were performed as previously described (43) using a ChIP It Express enzymatic kit from Active Motif (Rixensart, Belgium) according to the manufacturer's instructions. ChIP products were analyzed by quantitative and classical PCR using specific primers for BHLHB2 and BHLHB3 promoter (PCR primers are available on request).

**Construction of reporter plasmids and BHLHB2 and BHLHB3 promoter activity.** A human genomic clone (NR5-IH18RS), which contains NotI flanking regions corresponding to the BHLHB2 promoter was obtained from E. R. Zabarovsky (Microbiology and Tumor Biology Center and Center for Genomics and Bioinformatics, Karolinska Institute, Stockholm, Sweden). The  $-408/+75$  (according to the transcription starting site) fragment was then subcloned into the luciferase reporter gene vector pGL3-Enhancer (Promega) to obtain pB21 ( $-408/+75$ ). The  $-951/+407$  fragment was generated by PCR and ligated into pB21 to obtain pB22 ( $-951/+75$ ). The constructs pB23 ( $-264/+75$ ) and pB26 ( $-187/+75$ ) were generated by deletion of pB21. To obtain pB32, two genomic fragments, corresponding to the  $-940/-289$  and  $-524/+238$  regions of the BHLHB3 gene, were generated by PCR and combined to obtain the  $-940/+238$  fragment into pGL3-E vector. Mutations of the SRE motifs were performed as described previously (12). Mutagenesis was performed to replace bases 2, 4, and 6 of each identified SRE by thymidine residues (QuikChange mutagenesis kit; Qiagen).

Transfection studies were carried out on myoblasts or myotubes plated in 12-well plates as previously described (12). Firefly and *Renilla* luciferase activities (dual luciferase reporter assay system; Promega) were measured by using a Centro LB 960 Luminometer (Berthold Technology, Thoiry, France).

**Microarray analysis of myotubes overexpressing BHLHB2 and BHLHB3.** The procedure used to obtain and analyze microarray data has previously been described (43). Briefly, total RNA extracted from BHLHB2 and BHLHB3 overexpressing myotubes were hybridized on oligonucleotide microarrays produced by the French Genopole Network (RNG) consisting of 25,342 oligonucleotides of 50-mers printed on glass slides. Only spots with recorded data on the eight slides (four for BHLHB2 and four for BHLHB3) were selected for further analysis. With these selection criteria, 12,825 spots were retrieved. The data were analyzed by using the one-class significance analysis of microarray (SAM) procedure. Microarrays data are available in the GEO database under accession number GSE12947 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi>).

#### RESULTS

**SREBP-1a and -1c downregulate muscle-specific genes in human myotubes.** We recently reported that adenovirus-mediated expression of the mature nuclear forms of either SREBP-1a or SREBP-1c triggered the regulation of more than

TABLE 1. Muscle specific SREBP-1 target genes<sup>a</sup>

Symbol <sup>b</sup>	LLID	Fold		Description
		1A	1C	
GO 0006936: muscle contraction (2.84 e <sup>-5</sup> )				
ADRB2	154	-2.48	-2.61	Adrenergic, $\beta$ 2-receptor, surface
ALDOA	226	2.06		Aldolase A; fructose bisphosphate
ATP1A1	476	-2.27		ATPase; Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> transporting; $\alpha$ 1 polypeptide
ATP1A2	477	-2.31		ATPase; Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> transporting; $\alpha$ 2 (+) polypeptide
ATP2A2	488	-1.86		ATPase; Ca <sup>2+</sup> transporting. cardiac muscle; slow twitch 2
CACNG1	786	-7.42		Calcium channel; voltage dependent; gamma subunit 1
CASQ2	845	-3.45		Calsequestrin 2 (cardiac muscle)
CHRNA1	1134	-1.96		Cholinergic receptor; nicotinic; $\alpha$ 1 (muscle)
DTNA	1837	-4.02	-3.01	Dystrobrevin; $\alpha$
EDNRA	1909	-3.21		Endothelin receptor type A
FXYD1	5348		3.31	FXYD domain containing ion transport regulator 1 (phospholemman)
GAL	2660	4.28		Galanin
GJA1	2697	-4.83	-2.02	Gap junction protein, $\alpha$ 1; 43 kDa (connexin 43)
HRC	3270	-2.72		Histidine-rich calcium-binding protein
ID2B	84099	-1.60		Inhibitor of DNA-binding 2B; dominant-negative helix-loop-helix protein
KBTBD10	10324		-1.60	Kelch repeat and BTB (POZ) domain containing 10
KCNH2	3757	-1.73		Potassium voltage-gated channel; subfamily H ( <i>eag</i> -related); member 2
MRCL3	10627		-1.63	Myosin regulatory light chain MRCL3
MYBPC1	4604	-4.62		Myosin binding protein C; slow type
MYBPC2	4606	14.91	10.04	Myosin binding protein C; fast type
MYBPH	4608	-19.98		Myosin binding protein H
MYH2	4620	-6.45		Myosin heavy polypeptide 2; skeletal muscle; adult
MYH3	80184	16.48		Myosin heavy polypeptide 3
MYH6	4624		3.47	Myosin heavy polypeptide 6; cardiac muscle alpha
MYH8	4626	-8.82	-2.39	Myosin heavy polypeptide 8; skeletal muscle. perinatal
SCN7A	6332	2.64		Sodium channel; voltage gated; type VII alpha
SLC6A8	6535	-1.47		Solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, creatine), member 8
SMPX	23676	-8.55		Small muscle protein, X-linked
SNTA1	6640	1.70		Syntrophin, $\alpha$ 1 (dystrophin-associated protein A1)
SSPN	8082	-3.15		Sarcospan (Kras oncogene-associated gene)
TNNC2	7125	-2.83		Troponin C type 2 (fast)
TNNI1	7135	-2.32		Troponin I type 1 (skeletal. slow)
TNNI2	7136	-3.07		Troponin I type 2 (skeletal. fast)
TNNT2	7139	-1.88		Troponin T type 2 (cardiac)
TNNT3	7140	-2.83		Troponin T type 3 (skeletal, fast)
TPM1	7168	-4.54		Tropomyosin 1 ( $\alpha$ )
TPM3	7170		-2.44	Tropomyosin 3
TTN	7273	1.92	2.93	Titin
GO 0007517: muscle development (6.27 e <sup>-5</sup> )				
ACTG1	71	-2.86	-2.37	Actin, $\gamma$ 1
AEBP1	165	2.29		AE binding protein 1
CAV3	859	-1.94		Caveolin 3
COL5A3	50509	-1.53		Collagen type V, $\alpha$ 3
COL6A3	1293	1.40		Collagen type VI, $\alpha$ 3
CSRP2	1466	-4.25		Cysteine- and glycine-rich protein 2
CUGBP2	10659	-1.80		CUG triplet repeat, RNA binding protein 2
DSCR1	1827	-2.18	-1.78	Down syndrome critical region gene 1
EVC	2121	-1.50		Ellis van Creveld syndrome
FHL1	2273	-4.99		Four and a half LIM domain 1
FXYD1	5348		3.31	FXYD domain containing ion transport regulator 1 (phospholemman)
GDF8	2660	-6.20	-1.98	Growth differentiation factor 8 (myostatin)
HBEGF	1839	5.22	4.10	Heparin-binding EGF-like growth factor
HDAC5	10014	2.35		Histone deacetylase 5
HDAC9	9734	-2.15		Histone deacetylase 9
HSBP2	3316	-3.37		Heat shock 27-kDa protein 2
ITGA7	3679	-2.40		Integrin $\alpha$ 7
ITGB1BP2	26548	-4.72		Integrin $\beta$ 1 binding protein (melusin) 2
KRT19	3880	2.50		Keratin 19
MEF2C	4208	-6.73	-3.45	Myocyte enhancer factor 2C
MLLT7	4303	1.96	3.40	Myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia
MRAS	22808	-3.86	-2.03	Muscle RAS oncogene homolog

Continued on following page



TABLE 1—Continued

Symbol <sup>b</sup>	LLID	Fold		Description
		1A	1C	
MYH6	4624		3.47	Myosin heavy polypeptide 6, cardiac muscle, alpha
MYH10	4628	2.28		Myosin heavy polypeptide 10, nonmuscle
MYL1	4632	-4.16		Myosin light polypeptide 1, alkali; skeletal, fast
MYL4	4635		2.28	Myosin light polypeptide 4, alkali, atrial, embryonic
MYOD1	4654	-2.76		Myogenic differentiation 1
MYOG	4656	-7.42		Myogenin (myogenic factor 4)
NRD1	4898	3.97	2.59	Nardilysin (N-arginine dibasic convertase)
SGCD	6444	-5.09		Sarcoglycan delta (35-kDa dystrophin-associated glycoprotein)
SGCG	6445	-2.42		Sarcoglycan gamma (35-kDa dystrophin-associated glycoprotein)
SIX1	6495	-3.88	-2.85	Sine oculis homeobox homolog 1 ( <i>Drosophila</i> )
SMAD3	4088	-1.82	-1.78	SMAD, mothers against DPP homolog 3
SNTA1	6640	1.70		Syntrophin, $\alpha$ 1 (dystrophin-associated protein A1)
TEAD4	7004	-3.54		TEA domain family member 4
TMOD1	7111	-3.01		Tropomodulin 1
TNNT2	7139	-1.88		Troponin T type 2 (cardiac)
TTN	7273	1.92	2.93	Titin
VAMP5	10791	-3.03		Vesicle-associated membrane protein 5 (myobrevin)

<sup>a</sup> Listing of 1300 SREBP-1 targets genes identified previously (43) was analyzed by using FATiGO. Three GO classes were found to be statistically over-represented: muscle contraction (GO 0006936, adjusted  $P$  value =  $1.66 \times 10^{-4}$ ), striated muscle contraction (GO 0006941, adjusted  $P$  value =  $7.29 \times 10^{-5}$ ) and muscle development (GO 0007517, adjusted  $P$  value =  $6.51 \times 10^{-5}$ ).

<sup>b</sup> The adjusted  $P$  values are indicated in parentheses.

1,300 genes in human differentiated myotubes (43). Using FATiGO software (Babelomics) to analyze these microarray data, three Gene Ontology (GO) classes showed significant over-representation in the list of genes found to be regulated in the presence of SREBP-1 proteins compared to their representation in the human genome: “muscle contraction” (GO 0006936, adjusted  $P$  value =  $2.84 \times 10^{-5}$ ), the subclass “striated muscle contraction” (GO 0006941, adjusted  $P$  value =  $2.46 \times 10^{-5}$ ), and “muscle development” (GO 0007517, adjusted  $P$  value =  $6.27 \times 10^{-5}$ ). The corresponding genes with fold change values upon SREBP-1a or -1c expression are listed in Table 1. These genes encode transcription factors involved in muscle differentiation (i.e., MYOD1, MYOG, and MEF2C), as well as a large number of muscle contraction proteins (i.e., heavy and light chains of myosin, troponins, and titin). Most of them were downregulated in the presence of SREBP-1a or -1c (28 of 38 for “muscle contraction” and 26 of 39 for “muscle development”).

**Transcriptional repressor BHLHB2 and BHLHB3 genes are SREBP-1 target genes.** The SREBP-1s microarray data obtained on differentiated myotubes contain two BHLH family members that are upregulated upon SREBP-1s overexpression. The transcriptional repressors BHLHB2 and BHLHB3 show an ~2-fold increase in their expression levels (see the supplemental data in reference 43). Since recent report indicated that BHLHB3 is a potent inhibitor of muscle cell differentiation (2), we decided to focus on these factors. To assess SREBP-1a and -1c effects on BHLHB2 and BHLHB3 expression, we overexpressed nuclear SREBP-1 in human primary muscle cells at both myoblast and myotube stages and also *in vivo* in mouse tibialis anterior muscle. As shown in Fig. 1, overexpression of SREBP-1 in myoblasts, myotubes, and mouse muscle induced significant increases in both BHLHB2 and BHLHB3 mRNA and protein levels in all situations. As a control, we verified that overexpression of ADD1-DN, a dominant-negative mutant of SREBP-1 (27), does not significantly

affect BHLHB2 and BHLHB3 expression levels in cultured muscle cells.

The promoter sequences of the human BHLHB2 and BHLHB3 genes contain putative SRE motifs for SREBP-1 binding (located at -839/-830 and -32/-23 for BHLHB2; -651/-642 and +43/+52 for BHLHB3 relative to the respective transcription start sites). In addition, a degenerate motif was identified at -248/-238 (TCACAGGGT) in the BHLHB2 promoter. To investigate whether SREBP-1a and -1c increase BHLHB2 and BHLHB3 expression through promoter activation, we performed gene reporter experiments in muscle and nonmuscle cell lines transiently transfected with SREBP-1a- and/or SREBP-1c-expressing plasmids. Measurements of luciferase activities confirm that overexpression of SREBP-1 proteins strongly increases both BHLHB2 and BHLHB3 promoter activities in myoblasts, myotubes, and non-muscle HepG2 cells (Fig. 2A and B, left). Activation of the promoters in nonmuscle cells excluded the participation of additional muscle-specific factors in the induction of BHLHB2 and BHLHB3 by SREBP-1 proteins. To assess the involvement of the identified putative SREs in both promoters, we performed mutations and deletions of the various sites (Fig. 2A and B, right). Concerning the BHLHB2 promoter, deletion of the distal motif, as well as mutation of the proximal motif, did not modify enhancement of promoter activity by SREBP-1 proteins, whereas the deletion of the SRE-like motif suppressed SREBP-1 activation. Concerning the BHLHB3 promoter, mutation of either distal or proximal SREs suppressed promoter activation, showing that they are both involved in the response to SREBP-1. Finally, ChIP experiments further confirmed that SREBP-1 proteins directly bind the BHLHB2 and BHLHB3 promoters (Fig. 2C).

We then conclude that transcriptional repressors BHLHB2 and B3 are new direct target genes of SREBP-1, the expression of which is increased by SREBP-1 binding on their promoters.

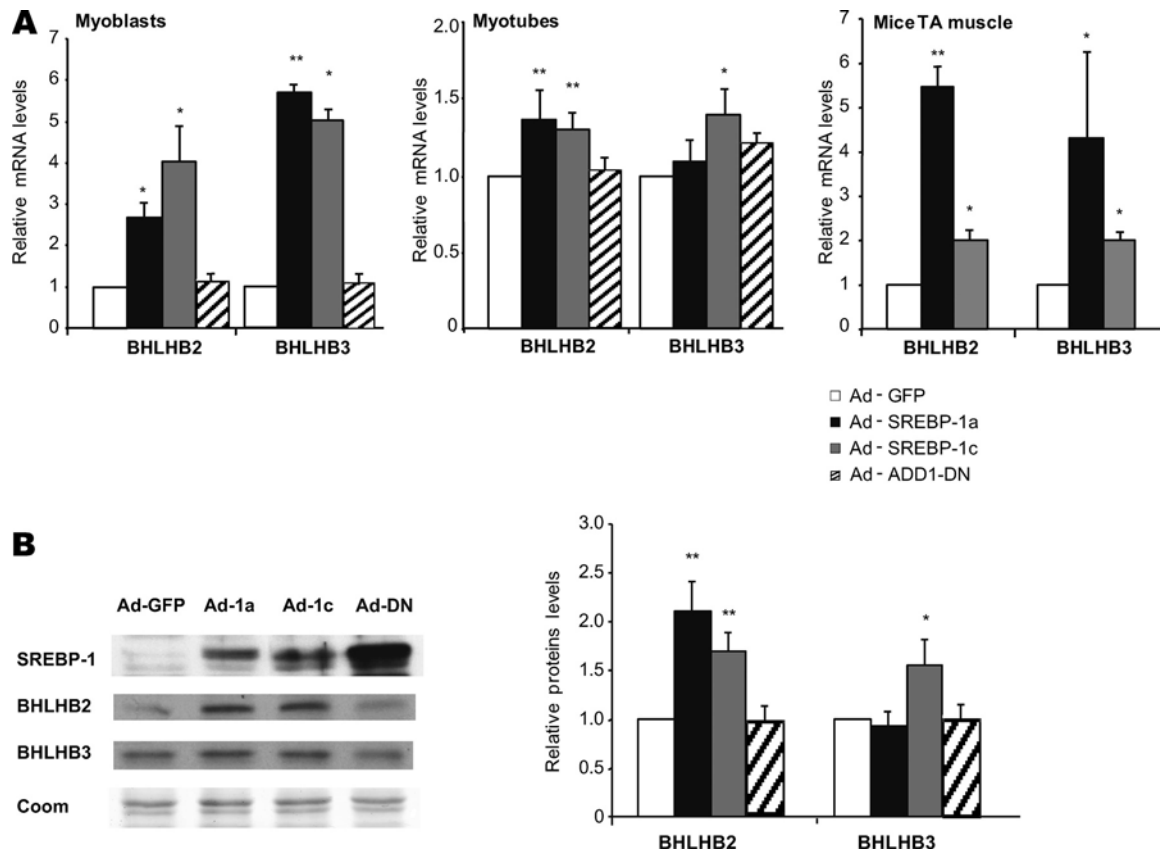


FIG. 1. BHLHB2 and -B3 are upregulated upon SREBP-1 overexpression. (A) mRNA levels of BHLHB2 and BHLHB3 in myoblasts, myotubes and mouse TA muscle overexpressing GFP, SREBP-1a, SREBP-1c, or ADD1-DN. (B) Protein levels of SREBP-1, BHLHB2, and BHLHB3 in myotubes overexpressing GFP, SREBP-1a, SREBP-1c, or ADD1-DN. An illustrative immunoblot on the left and a quantification of the results on the right are shown. Coomassie blue (Coom) staining was used to normalize the total amount of proteins. The results are presented as means  $\pm$  the SEM. \*,  $P \leq 0.05$ ; \*\*,  $P \leq 0.001$  ( $n = 3$ ).

**Overexpression of BHLHB2 and BHLHB3 in myotubes.** We performed microarray analysis in human primary myotubes overexpressing either BHLHB2 or BHLHB3 after adenovirus infection. FATiGO analysis revealed that the same biological processes identified after SREBP-1 overexpression (“muscle contraction,” “striated muscle contraction,” and “muscle development”) were significantly enriched (adjusted  $P$  values  $< 0.05$ ) in the lists of regulated genes. We found that BHLHB2 and BHLHB3 downregulated 69 and 65 genes with muscle annotation, respectively (Table 2). Furthermore, the comparison with the SREBP-1 microarray data showed that a large proportion (34%) of the muscle-specific genes that were downregulated by SREBP-1 expression were also downregulated by BHLHB2/B3 overexpression.

Overlapping downregulated genes for the two GO biological processes “muscle development” and “muscle contraction” are represented in Fig. 3. Among genes involved in muscle differentiation, MYOD1, MYOG, and MEF2C show a decrease in their expression upon both SREBP-1 and BHLHB2/B3 overexpression.

**SREBP-1a and -1c inhibit myoblast differentiation.** Because the expression of specific markers of muscle differentiation was decreased in myotubes overexpressing SREBP-1, we first examined the expression of the four studied transcrip-

tion factors during the differentiation of human primary muscle cells (Fig. 4A). All four present a similar pattern of expression with an increase during proliferation and a decrease after induction of differentiation. To further examine whether SREBP-1 could directly affect myogenic differentiation, primary human myoblasts were thus infected with recombinant adenoviruses expressing GFP, SREBP-1a, or SREBP-1c. After 48 h, SREBP-1-expressing myoblasts showed a dramatic decrease in MYOD1, MYOG, and MEF2C levels (Fig. 4B). When the cells were induced to differentiate (medium change and serum starvation) for 5 days, only Ad-GFP-infected cells underwent differentiation (Fig. 4C). The presence of SREBP-1 totally blocked the differentiation of myoblasts into myotubes.

To determine the implication of BHLHB2 and/or BHLHB3 in this process, human primary myoblasts were infected with recombinant adenovirus expressing either BHLHB2 or BHLHB3. As shown in Fig. 4D, 48 h of BHLHB2 and BHLHB3 overexpression also induced a marked decrease in the expression of muscle regulatory factors (MYOD1, MYOG, and MEF2C). After 5 days of differentiation, we observed a dramatic decrease in the number and the size of polynucleated cells, correlated with the reduced expression of myogenin and troponin (Fig. 4E).

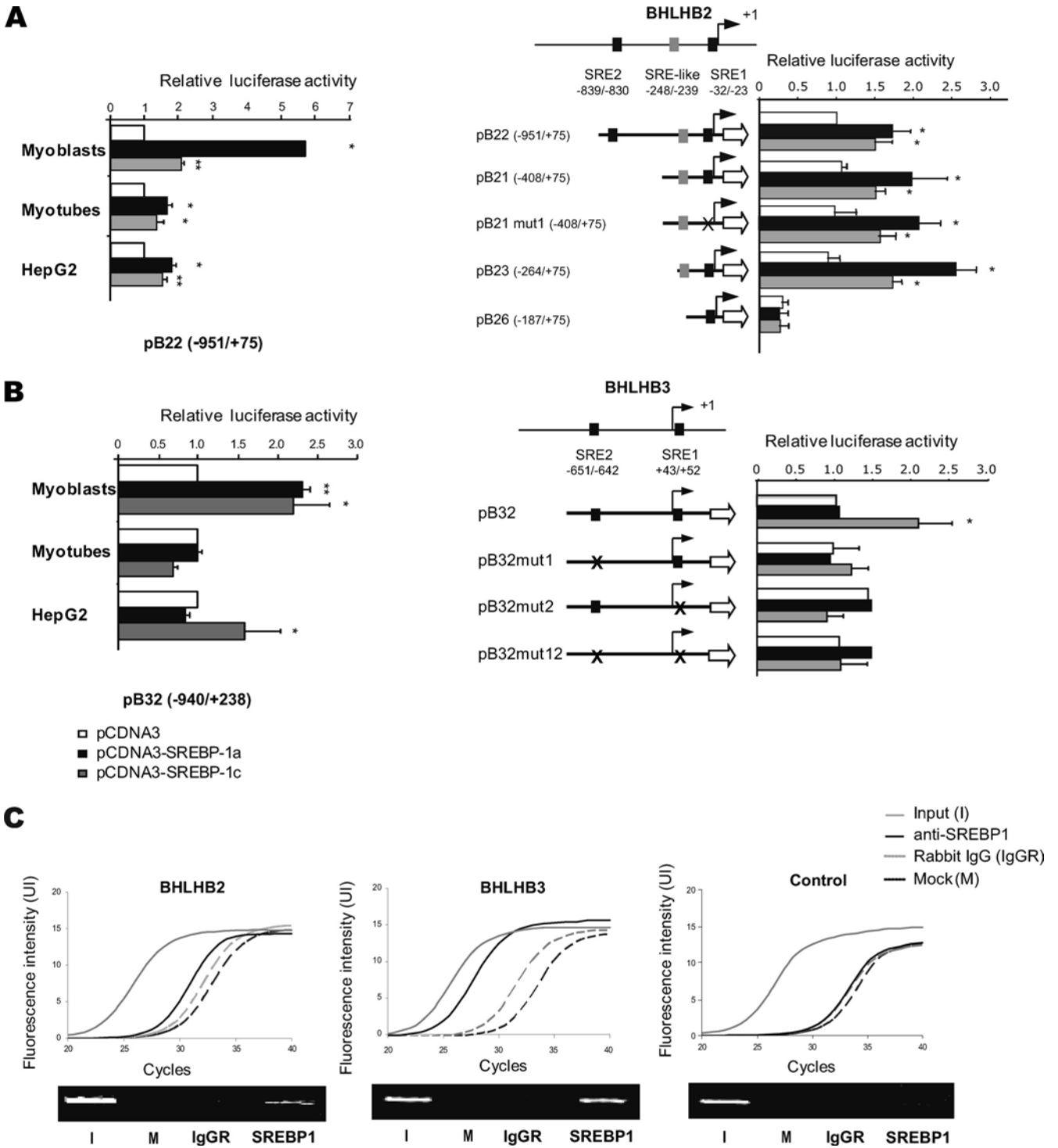


FIG. 2. BHLHB2 and -B3 genes are SREBP-1 target genes. BHLHB2 (A, left panel) and BHLHB3 (B, left panel) promoter activity in myoblasts, myotubes, and HepG2 cells cotransfected with reporter gene plasmid pB22 or pB32 and expression vectors encoding either human SREBP-1a (pCDNA-hSREBP1a) or SREBP-1c (pCDNA-hSREBP1c), or empty pCDNA3 as control. On the right panels, relative luciferase activity in HepG2 cells of constructs harboring mutations of SRE motifs identified in either BHLHB2 (A) or BHLHB3 (B) promoters. (C) Recruitment of SREBP1 on BHLHB2 and BHLHB3 promoters determined by ChIP experiments carried on insulin-treated HEK 293 cells. ChIP products were analyzed by quantitative and classical PCR. The results are presented as means  $\pm$  the SEM. \*,  $P \leq 0.05$ ; \*\*,  $P \leq 0.001$  ( $n = 4$ ).

TABLE 2. Muscle-specific BHLHB2/B3 target genes<sup>a</sup>

LLID	Symbol	Fold		Description
		B2	B3	
58	ACTA1	-2.89	-4.55	Actin, $\alpha$ 1, skeletal muscle
70	ACTC	-1.78	-2.75	Actin, $\alpha$ , cardiac muscle
88	ACTN2	-1.69		Actinin, $\alpha$ 2
89	ACTN3	-2.67	-3.27	Actinin, $\alpha$ 3
203	AK1	-1.56	-2.19	Adenylate kinase 1
10930	APOBEC2		-1.76	Apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like 2
57679	ALS2	1.75		Amyotrophic lateral sclerosis 2 (juvenile)
130540	ALS2CR12	1.41		Amyotrophic lateral sclerosis 2 (juvenile) chromosome region, candidate 12
26287	ANKRD2	-1.52		Ankyrin repeat domain 2 (stretch responsive muscle)
316	AOX1	1.51		Aldehyde oxidase 1
487	ATP2A1	-1.83		ATPase, Ca <sup>2+</sup> transporting, cardiac muscle, fast twitch 1
444	ASPH		1.57	Aspartate $\beta$ -hydroxylase
79888	AYTL2	1.80		Acytransferase-like 2
8678	BECN1	1.36		Beclin 1 (coiled-coil, myosin-like BCL2 interacting protein)
779	CACNA1S	-1.36	-1.68	Calcium channel, voltage-dependent, L type, $\alpha$ 1S subunit
782	CACNB1	-2.85		Calcium channel, voltage-dependent, $\beta$ 1 subunit
786	CACNG1	-2.06	-5.29	Calcium channel, voltage-dependent, gamma subunit 1
823	CAPN1	1.37		Calpain 1 ( $\mu$ /I) large subunit
84698	CAPS2	1.34		Calcyphosine 2
859	CAV3	-1.73	-3.44	Caveolin 3
928	CD9	1.96		CD9 molecule
1013	CDH15		-2.07	Cadherin 15, M-cadherin (myotubule)
50937	CDON	-1.59	-2.79	Cdon homolog (mouse)
1072	CFL1	-1.38		Cofilin 1 (nonmuscle)
1134	CHRNA1	-1.71		Cholinergic receptor, nicotinic, $\alpha$ 1 (muscle)
1146	CHRNA1	-2.34	-2.31	Cholinergic receptor, nicotinic, $\gamma$
1152	CKB	-1.42		Creatine kinase, brain
1158	CKM	-2.33	-2.90	Creatine kinase, muscle
1160	CKMT2	-4.09	-3.86	Creatine kinase, mitochondrial 2 (sarcomeric)
50509	COL5A3	-1.74	-1.62	Collagen type V, $\alpha$ 3
1339	COX6A2	-1.55		Cytochrome <i>c</i> oxidase subunit VIa polypeptide 2
1410	CRYAB	-2.02	-2.12	Crystallin, $\alpha$ B
1674	DES	-1.58	-1.80	Desmin
25891	DKFZP586H2123	1.35		Regeneration-associated muscle protease
1760	DMPK	-1.97	-2.84	<i>Dystrophia myotonica</i> protein kinase
1837	DTNA		1.89	Dystrobrevin, alpha
1838	DTNB		-1.49	Dystrobrevin, beta
8291	DYSF		-1.59	Dysferlin, limb girdle muscular dystrophy 2B (autosomal recessive)
1917	EEF1A2	-1.98	-2.26	Eukaryotic translation elongation factor 1 $\alpha$ 2
112399	EGLN3			Egl nine homolog 3 ( <i>C. elegans</i> )
2027	ENO3	-1.82	-1.91	Enolase 3 (beta, muscle)
114907	FBXO32	2.07		F-box protein 32
2281	FKBP1B		2.16	FK506 binding protein 1B, 12.6 kDa
2318	FLNC		-2.30	Filamin C, gamma (actin binding protein 280)
2308	FOXO1	-1.46	-2.20	Forkhead box O1
2660	GDF8	2.18		Growth differentiation factor 8
93626	GNA11	1.34		Guanine nucleotide binding protein (G protein), $\alpha$ 11 (Gq class)
2997	GYS1	-1.83		Glycogen synthase 1 (muscle)
9759	HDAC4	-1.57	-1.69	Histone deacetylase 4
3270	HRC	-1.58	-1.68	Histidine-rich calcium binding protein
3679	ITGA7		-1.59	Integrin, $\alpha$ 7
10324	KBTBD10	1.86		Kelch repeat and BTB (POZ) domain containing 10
3939	LDHA	-1.55		Lactate dehydrogenase A
6300	MAPK12	-1.97	-2.85	Mitogen-activated protein kinase 12
4151	MB	-1.90	-1.52	Myoglobin
10150	MBNL2	1.57		Muscleblind-like 2 ( <i>Drosophila</i> )
4208	MEF2C		-1.95	MADS box transcription enhancer factor 2, polypeptide C (myocyte enhancer factor 2C)
22808	MRAS		-2.11	Muscle RAS oncogene homolog
23164	M-RIP		-1.84	Myosin phosphatase-Rho interacting protein
103910	MRLC2	1.57		Myosin regulatory light chain MRLC2
136319	MTPN	1.76		Myotrophin
4604	MYBPC1	-1.69		Myosin binding protein C, slow type
4608	MYBPH		-2.69	Myosin binding protein H
4620	MYH2	-1.76		Myosin heavy polypeptide 2, skeletal muscle, adult
80184	MYH3 (CEP290)	-1.69	-3.82	Myosin heavy polypeptide 3

Continued on following page



TABLE 2—Continued

LLID	Symbol	Fold		Description
		B2	B3	
4624	MYH6	-1.41	-1.71	Myosin heavy polypeptide 6, cardiac muscle, alpha
4625	MYH7	-1.70	-3.28	Myosin heavy chain 7, cardiac muscle, beta
8735	MYH13	-1.42		Myosin heavy chain 13
4632	MYL1	-1.41		Myosin light polypeptide 1, alkali; skeletal, fast
4633	MYL2	-1.81	-2.23	Myosin light chain 2, regulatory, cardiac, slow
4634	MYL3	-1.69	-1.72	Myosin light chain 3, alkali; ventricular, skeletal, slow
4636	MYL5	-1.84		Myosin light chain 5, regulatory
93408	MYLC2PL	1.31		Myosin light chain 2, precursor lymphocyte-specific
85366	MYLK2	1.33		Myosin light chain kinase 2, skeletal muscle
53904	MYO3A	1.48		Myosin IIIA
4645	MYO5B	-1.54		Myosin VB (GDB)
4654	MYOD1	-1.71		Myogenic differentiation 1
4656	MYOG	-1.91	-5.79	Myogenin (myogenic factor 4)
9172	MYOM2	-3.03	-3.11	Myomesin (M-protein) 2, 165 kDa
9499	MYOT	-2.95	-3.67	Myotilin
84665	MYPN	-1.60		Myopalladin
4692	NDN		1.44	Necdin homolog (mouse)
4703	NEB		-1.72	Nebulin
84033	OBSCN	-1.39	-2.46	Obscurin, cytoskeletal calmodulin and titin-interacting RhoGEF
55229	PANK4	-1.32		Pantothenate kinase 4
5081	PAX7	-1.42		Paired box 7
5213	PFKM	-1.48		Phosphofructokinase, muscle
5224	PGAM2	-2.57	-2.60	Phosphoglycerate mutase 2 (muscle)
64091	POPDC2		-1.36	Popeye domain containing 2
64208	POPDC3		-1.78	Popeye domain containing 3
10891	PPARGC1A	-2.32		Peroxisome proliferator-activated receptor gamma, coactivator 1 $\alpha$
4659	PPP1R12A	1.45		Protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 12A
53632	PRKAG3	-2.16	-6.45	Protein kinase, AMP-activated, $\gamma$ 3 noncatalytic subunit
89970	RSPRY1	-1.43		Ring finger and SPRY domain containing 1
6415	SEPW1	-1.40	-1.48	Selenoprotein W, 1
6444	SGCD	-1.61	-1.39	Sarcoglycan, delta (35-kDa dystrophin-associated glycoprotein)
6445	SGCG		-1.96	Sarcoglycan, gamma (35-kDa dystrophin-associated glycoprotein)
6526	SLC5A3	-1.93		Sodium/myoinositol cotransporter 1
6535	SLC6A8		-1.59	Solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, creatine), member 8
6586	SLIT3		-3.95	Slit homolog 3 ( <i>Drosophila</i> )
6641	SNTB1		-1.92	Syntrophin, $\beta$ 1 (dystrophin-associated protein A1, 59 kDa, basic component 1)
8878	SQSTM1	1.52		Sarcospan (Kras oncogene-associated gene)
8082	SSPN		-1.69	Sarcospan (Kras oncogene-associated gene)
6840	SVIL	1.52	-1.39	Titin-cap (telethonin)
23345	SYNE1		1.40	Supervillin
8557	TCAP	-1.80		Spectrin repeat containing, nuclear envelope 1
7004	TEAD4	-2.37	-4.18	TEA domain family member 4
7111	TMOD1		-2.13	Tropomodulin 1
29766	TMOD3	1.66	1.49	Tropomodulin 3 (ubiquitous)
7134	TNNC1		-1.59	Troponin C type 1 (slow)
7135	TNNI1	-2.46	-2.34	Troponin I type 1 (skeletal, slow)
7136	TNNI2	-1.40	-1.52	Troponin I type 2 (skeletal, fast)
7139	TNNT2	-1.48	-2.12	Troponin T type 2 (cardiac)
7140	TNNT3	-2.07	-2.13	Troponin T type 3 (skeletal, fast)
57159	TRIM54		-1.79	Tripartite motif-containing 54
84675	TRIM55	-1.61	-2.56	Tripartite motif-containing 55
84676	TRIM63	-3.91	-4.12	Tripartite motif-containing 63
7273	TTN	-1.90	-4.98	Titin
81622	UNC93B1	-1.78		Unc-93 homolog B1 ( <i>C. elegans</i> )
7431	VIM	1.82		Vimentin

<sup>a</sup> Microarray analysis was performed on human primary muscle cells overexpressing either BHLHB2 or BHLHB3. The listing of BHLHB2/B3 identified target genes was analyzed by using FATiGO software. The biological processes "muscle contraction," "striated muscle contraction," and "muscle development" show significant enrichment (adjusted *P* value < 0.05).

To finally demonstrate the involvement of BHLHB2 and BHLHB3 in the effects of SREBP-1 on myoblasts, SREBP-1-overexpressing myoblasts were transfected with siRNA against GFP (control), BHLHB2, or BHLHB3, resulting in a partial gene extinction of BHLHB2 and BHLHB3 expression (Fig. 5A). As shown in Fig. 5B, inhibition of either BHLHB2 or BHLHB3 can

restore, at least partially, the expression of MYOD1, MYOG, and MEF2C proteins that are downregulated upon SREBP-1 overexpression. Depletion of BHLHB2/B3 was sufficient to restore differentiation and myogenin and troponin expression in cells overexpressing SREBP-1 (Fig. 5C).

Altogether, these data led us to propose that SREBP-1a and

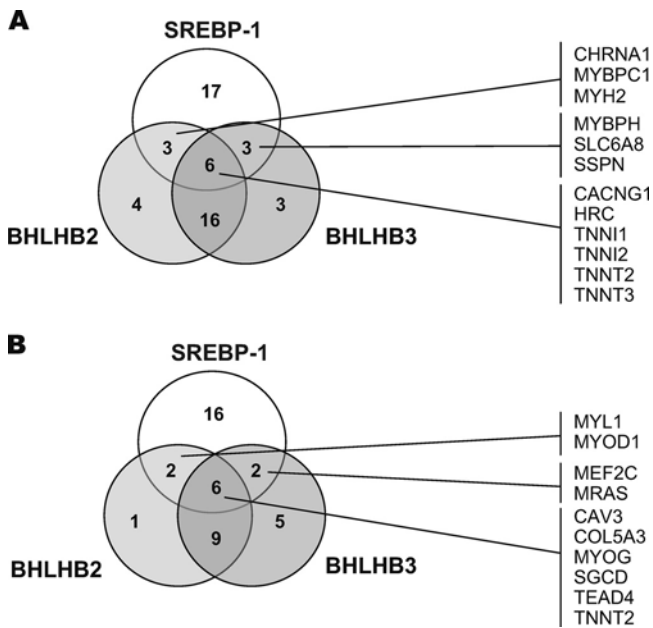


FIG. 3. Common SREBP-1, BHLHB2, and BHLHB3 downregulated muscle genes. Venn diagrams representing the distribution of SREBP-1, BHLHB2, and BHLHB3 downregulated genes corresponding to “muscle development” (GO 0007517) (A) and “muscle contraction” (GO 0006936) (B) are shown. Overlapping genes are listed on the right.

-1c block myoblast-to-myotube differentiation via an increase in BHLHB2 and BHLHB3 expression, the latter repressing the expression of muscle regulatory factors (MRFs).

**SREBP-1a and -1c induce atrophy of differentiated myotubes.** We next examined the consequences of nuclear accumulation of SREBP-1 proteins in differentiated muscle cells. To confirm and expand the microarray data, we measured the expression levels of several transcription factors and sarcomeric protein genes using quantitative PCR in primary myotubes overexpressing the SREBP-1 factors for 48 h. Figure 6 shows that both SREBP-1a and -1c decreased the expression of myogenic regulatory factors (MYOD1, MYOG, and MEF2C) (Fig. 6A). A significant reduction in the mRNA levels of muscle contractile proteins (TTN, TNNI1, TNNI2, and MYL1) was also observed. These data were further confirmed at the protein level (Fig. 6B). Therefore, the mature forms of SREBP-1a and -1c clearly induced a dramatic decrease in the expression of major actors of skeletal muscle function, involved in either formation or contractility.

Direct observation of myotubes overexpressing SREBP-1 showed a decrease in cell surfaces. Troponin immunostaining confirmed a considerable reduction in sarcomeric protein content (Fig. 6C). Cell sizes measurements showed that SREBP-1 proteins induced an ~6-fold decrease in cell surface (Fig. 6D). These observations indicated thus that nuclear accumulation of SREBP-1 led to myotube atrophy, with a severe decrease in the expression of muscle regulatory factors and sarcomeric proteins. To assess whether the observed SREBP1-induced atrophy involved known atrophic factors, we measured the mRNA levels of FBXO32 (Atrogin1), MURF1 (MuRF1/TRIM63), and FOXO1. As shown in Fig. 6A, with the excep-

tion of MURF1, the expression of these factors was reduced in the presence of SREBP-1a and -1c. The upregulation of MURF1 mRNA, however, is in agreement with our previous microarray data (43).

As observed with SREBP-1a and -1c, infection of fully differentiated myotubes with adenoviruses expressing BHLHB2 or BHLHB3 strongly repressed the expression of myogenic factors (MYOD1, MYOG, and MEF2C) and sarcomeric proteins (MYL1, TNNI1, and TTN) (Fig. 7A). Overexpression of BHLHB2 and BHLHB3 also provoked the atrophy of muscle cells (Fig. 7B), as evidenced by cell size measurements indicating a >60% reduction in myotube areas (Fig. 7C). However, in contrast to SREBP-1, BHLHB2 and BHLHB3 overexpression induced a marked decrease in MURF1 expression level (Fig. 7A).

To confirm the involvement of BHLHB2 and BHLHB3 in the atrophic effect of SREBP-1 on differentiated myotubes, SREBP-1 overexpressing myotubes were transfected with siRNA against GFP, BHLHB2, or BHLHB3. As shown in Fig. 7D, gene extinction of either BHLHB2 or BHLHB3 restored the expression of troponin. Depletion of BHLHB2/B3 also restored, at least partially, the size of myotubes, with a greater effect of BHLHB3 silencing (Fig. 7E).

Altogether, these data indicated that, as observed for inhibition of myoblast differentiation, the transcriptional repressors BHLHB2 and BHLHB3 are directly involved in the atrophy induced by SREBP-1 in differentiated myotubes.

#### SREBP-1a and -1c promote skeletal muscle atrophy *in vivo*.

To investigate the effects of SREBP-1 factors on muscle phenotype *in vivo*, we overexpressed SREBP-1a or SREBP-1c in limb muscle of mice using recombinant adenovirus. Adenoviruses expressing either GFP only, or both SREBP-1a and GFP (or SREBP-1c and GFP) were generated using dual expression properties of constructs containing an IRES element (26). Twelve-week-old BALB/c male mice were separated into two groups, and adenoviral suspensions were injected in tibialis anterior muscle with  $10^{10}$  infectious units of recombinant adenoviruses expressing only GFP (Ad-GFP) in the left limb of all animals and either SREBP-1a and GFP (Ad-1a/GFP, first group) or SREBP-1c and GFP (Ad-1c/GFP, second group) in the right limb. Animals were sacrificed 7 days after injections, and tibialis anterior muscles were removed for analysis. When comparing the two groups, no differences were found in GFP-only expressing muscles of the left limbs (weight, fiber sizes, and fluorescence intensity); we thus considered the data concerning Ad-GFP-infected muscles as a unique set. As shown in Fig. 8A, tibialis anterior weight showed a significant decrease of 17.5% (SREBP-1a/GFP versus GFP,  $n = 7$ ,  $P = 0.001$ ) and 18.6% (SREBP-1c/GFP versus GFP,  $n = 7$ ,  $P = 0.002$ ) when expressing either of the SREBP-1 proteins. When we performed a similar experiment with intramuscular injection of recombinant adenoviruses overexpressing either BHLHB2 or BHLHB3, muscle weight showed a decrease of 17.1% (BHLHB2 versus GFP,  $n = 7$ ,  $P = 0.001$ ) and 24.8% (BHLHB3 versus GFP,  $n = 7$ ,  $P = 0.001$ ), respectively (Fig. 8A). We next examined fiber size in histological sections of treated muscles. Quantitative analysis revealed a significant decrease in average cross-sectional area (CSA) of myofibers for both SREBP-1a (mean  $\pm$  the standard error of the mean [SEM] =  $1,998.3 \pm 19.7 \mu\text{m}^2$ ) and SREBP-1c (mean  $\pm$  the

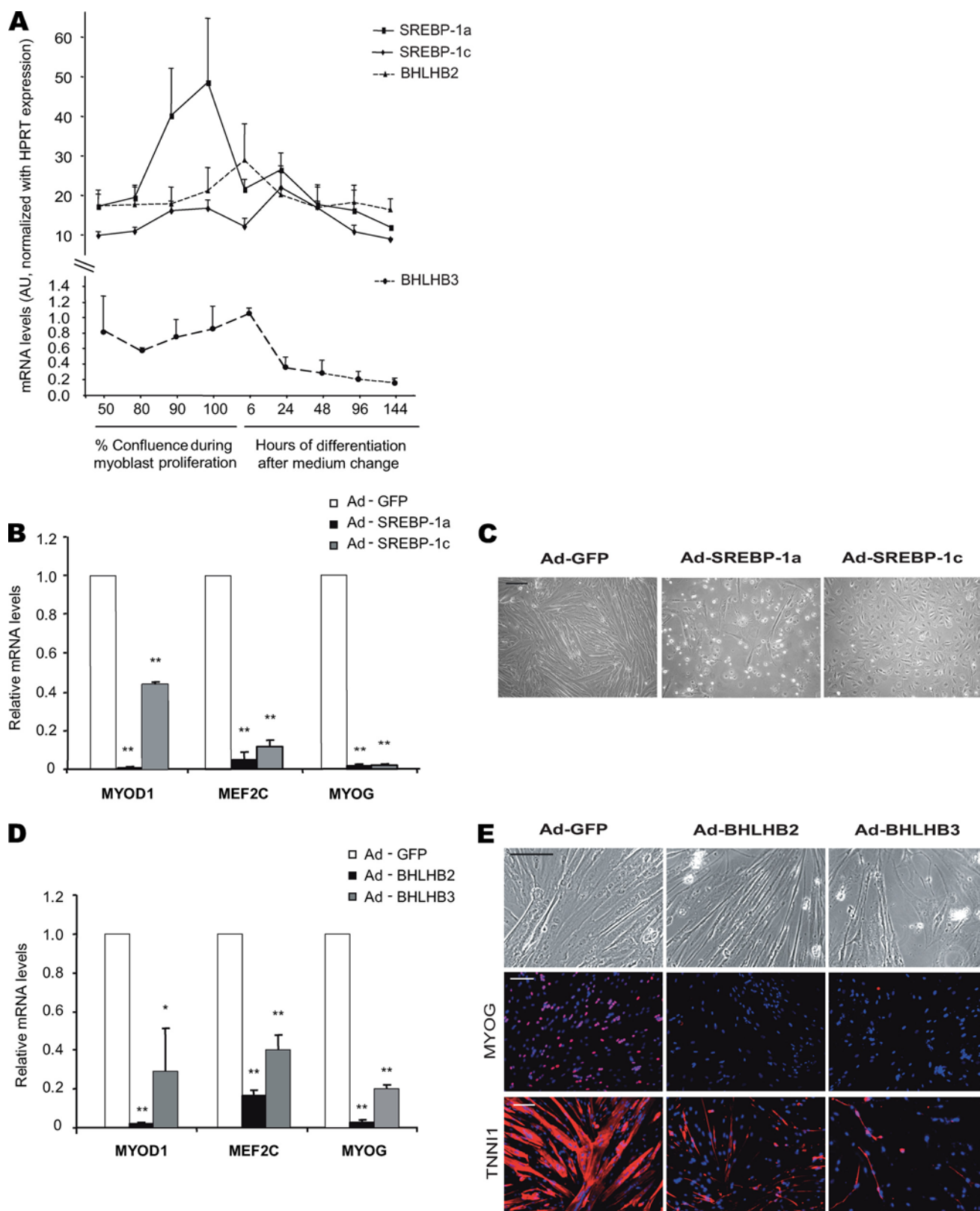


FIG. 4. SREBP1 and BHLHB2/B3 inhibit human myoblasts differentiation. (A) mRNA levels of SREBP-1a, SREBP-1c, BHLHB2, and BHLHB3 in human primary muscle cells showing an increase during proliferation and a decrease after induction of differentiation. (B) mRNA levels of myogenic factors (MYOD, MEF2C, and MYOG) in myoblasts overexpressing GFP, SREBP1a, or SREBP1c. (C) Representative phase-contrast images of myoblasts overexpressing GFP, SREBP1a, or SREBP1c after 5 days of differentiation. Scale bar, 100  $\mu$ m. (D) mRNA levels of myogenic factors (MYOD, MEF2C, and MYOG) in myoblasts overexpressing GFP, BHLHB2, or BHLHB3. (E) Representative images of myoblasts overexpressing GFP, BHLHB2, or BHLHB3 after 5 days of differentiation. Scale bar, 100  $\mu$ m. Myogenin (MYOG) and troponin I1 (TNNI1) immunostaining (red), with DAPI staining (blue), was performed to assess the differentiation state. The results are presented as means  $\pm$  the SEM. \*,  $P \leq 0.05$ ; \*\*,  $P \leq 0.001$  ( $n = 3$ ).



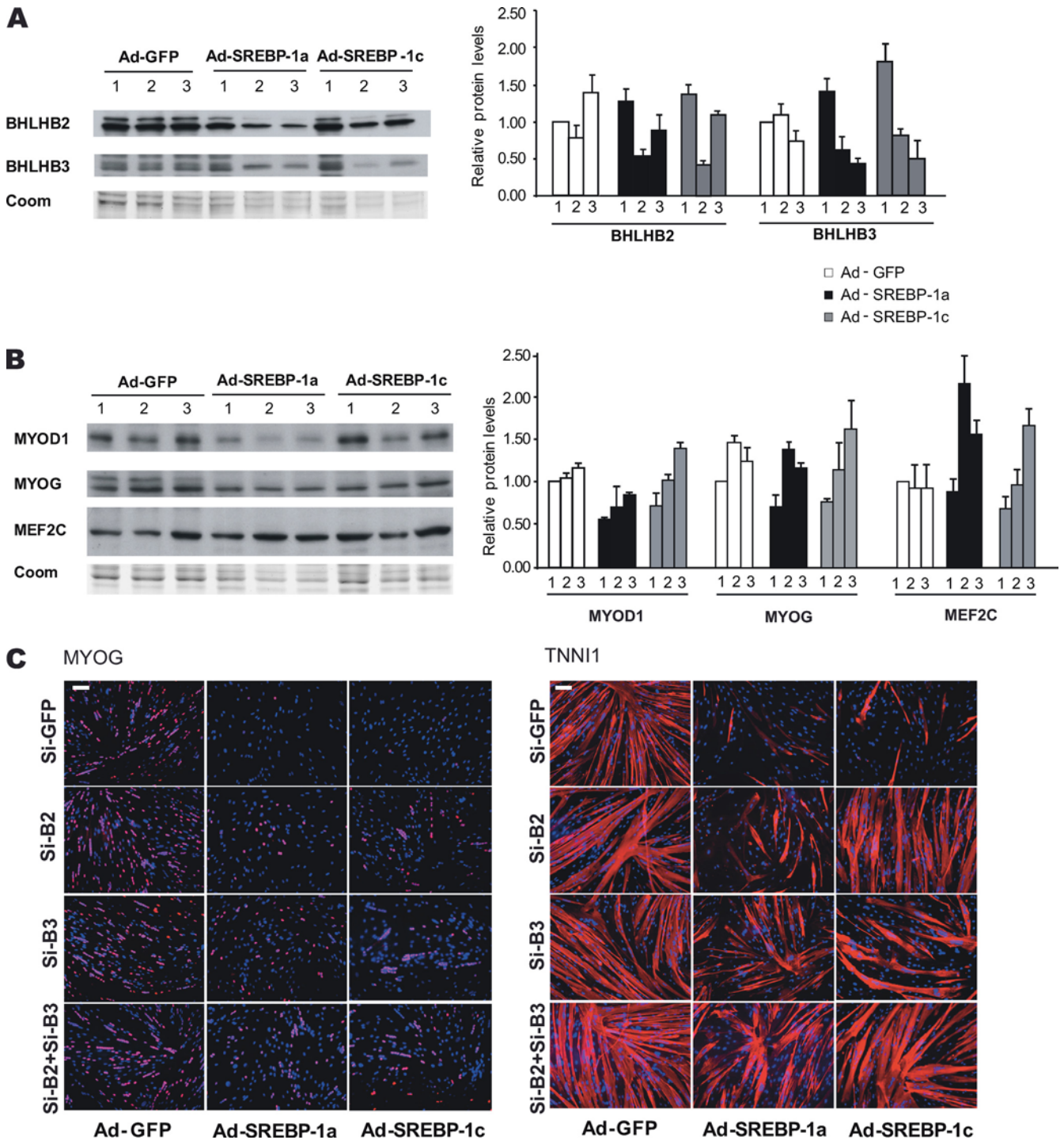


FIG. 5. SREBP-1 inhibit human myoblasts differentiation through BHLHB2/B3 repressors. Human myoblasts were infected for 48 h with recombinant adenoviruses encoding SREBP-1a, or SREBP-1c, or GFP and cotransfected for 72 h with siRNA against BHLHB2 or BHLHB3 or both or with siRNA against GFP as control. Representative immunoblots of BHLHB2 and BHLHB3 (A) and MYOD1, MYOG, and MEF2C (B) in myoblasts transfected with siRNA against GFP (lanes 1) BHLHB2 (lanes 2) or BHLHB3 (lanes 3) and quantification of the protein levels (right panels). Coomassie blue (Coom) staining was used to normalize the total amount of proteins. The results are presented as means  $\pm$  the SEM. \*,  $P \leq 0.05$ ; \*\*,  $P \leq 0.001$  ( $n = 3$ ). (C) Representative images of myoblasts overexpressing GFP, SREBP-1a, or SREBP-1c and transfected with siRNA against GFP (line 1), BHLHB2 (line 2), BHLHB3 (line 3), and both BHLHB2 and BHLHB3 (line 4) after 5 days of differentiation. Scale bar, 100  $\mu$ m. Myogenin (MYOG, left) and troponin II (TNNI1, right) immunostaining (red), with DAPI staining (blue), was performed to assess the differentiation state.

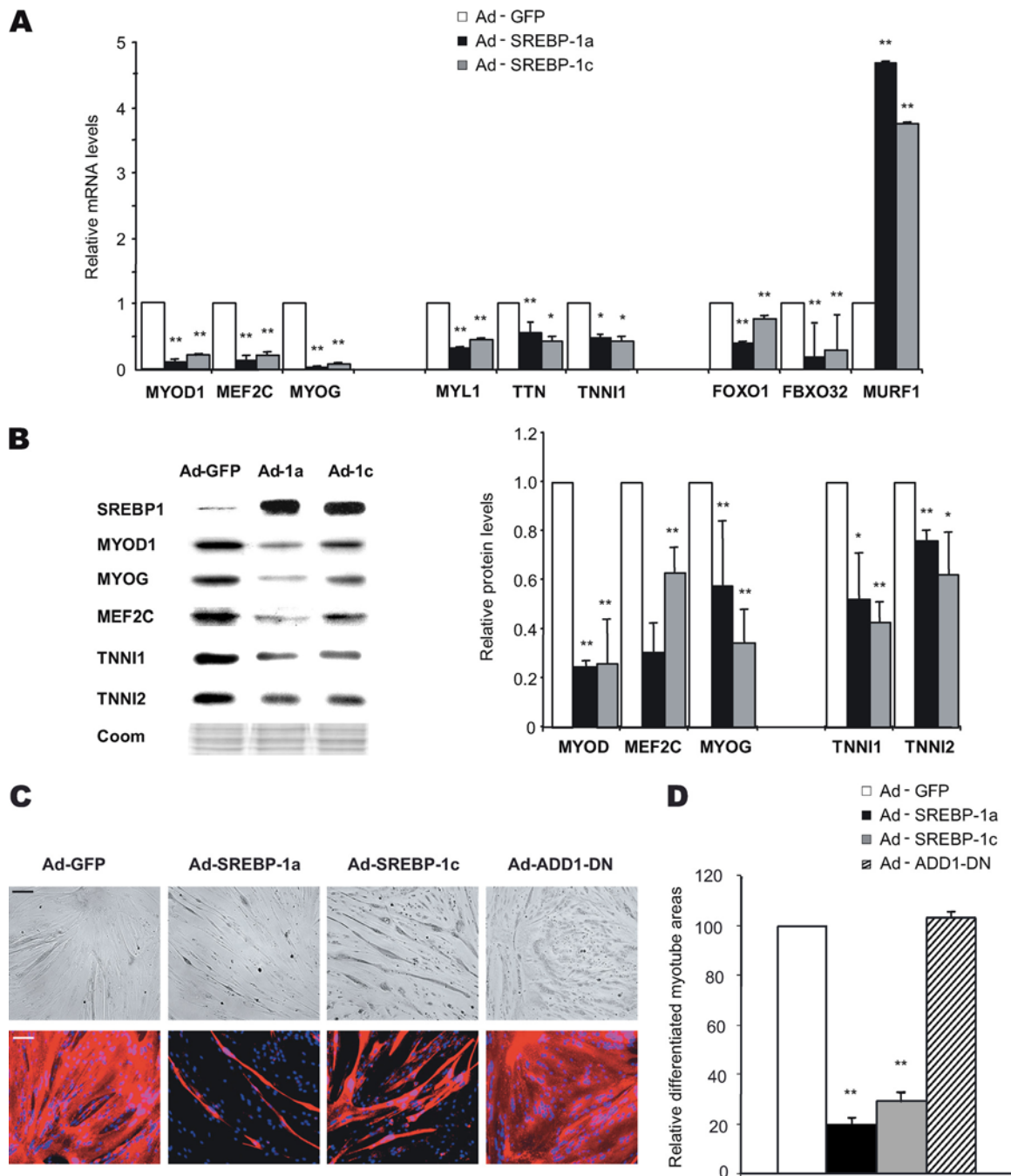


FIG. 6. SREBP-1 induce human myotubes atrophy. Human myotubes were infected for 48 h with recombinant adenoviruses encoding GFP, SREBP-1a, or SREBP-1c. (A) mRNA levels of myogenic factors (MYOD1, MEF2C, and MYOG), sarcomeric proteins (MYL1, TNN, TNNI1, or TNNI2), and atrogenic factors (FOXO1, FBXO32, and MURF1) ( $n = 6$  in each group). (B) Protein levels of SREBP1, MYOD1, MYOG, MEF2C, TNNI1, and TNNI2. Coomassie blue (Coom) staining was used to normalize the total amount of proteins ( $n = 4$  in each group). (C) Representative images of myotubes overexpressing GFP, SREBP-1a, SREBP-1c, and ADD1-DN. Scale bar, 100  $\mu\text{m}$ . The upper panels show phase contrast images; the lower panels show immunostaining with TNNI1 antibody (red) and DAPI staining (blue). (D) Measurement of the area of myotubes overexpressing GFP, SREBP-1a, and SREBP-1c stained with TNNI1 antibody ( $n = 3$  in each group). The results are presented as mean  $\pm$  the SEM. \*,  $P \leq 0.05$ ; \*\*,  $P \leq 0.001$ .

SEM =  $1,950.2 \pm 21.0 \mu\text{m}^2$ ) compared to GFP (mean  $\pm$  the SEM =  $2,378.6 \pm 21.7 \mu\text{m}^2$ ,  $P < 0.001$  for both) (Fig. 8B). Size distribution of muscle fiber CSA was different between GFP-only and SREBP-1/GFP-expressing muscles, the latter presenting a marked displacement of distribution toward

smaller sizes of fibers (Fig. 8C). Representative histological sections are shown in Fig. 8D with the expected mosaic pattern of fluorescence. Because of the dual expression strategy, fluorescence intensities in the muscle fibers of the right limbs reflect the level of expression of the SREBP-1 recombinant

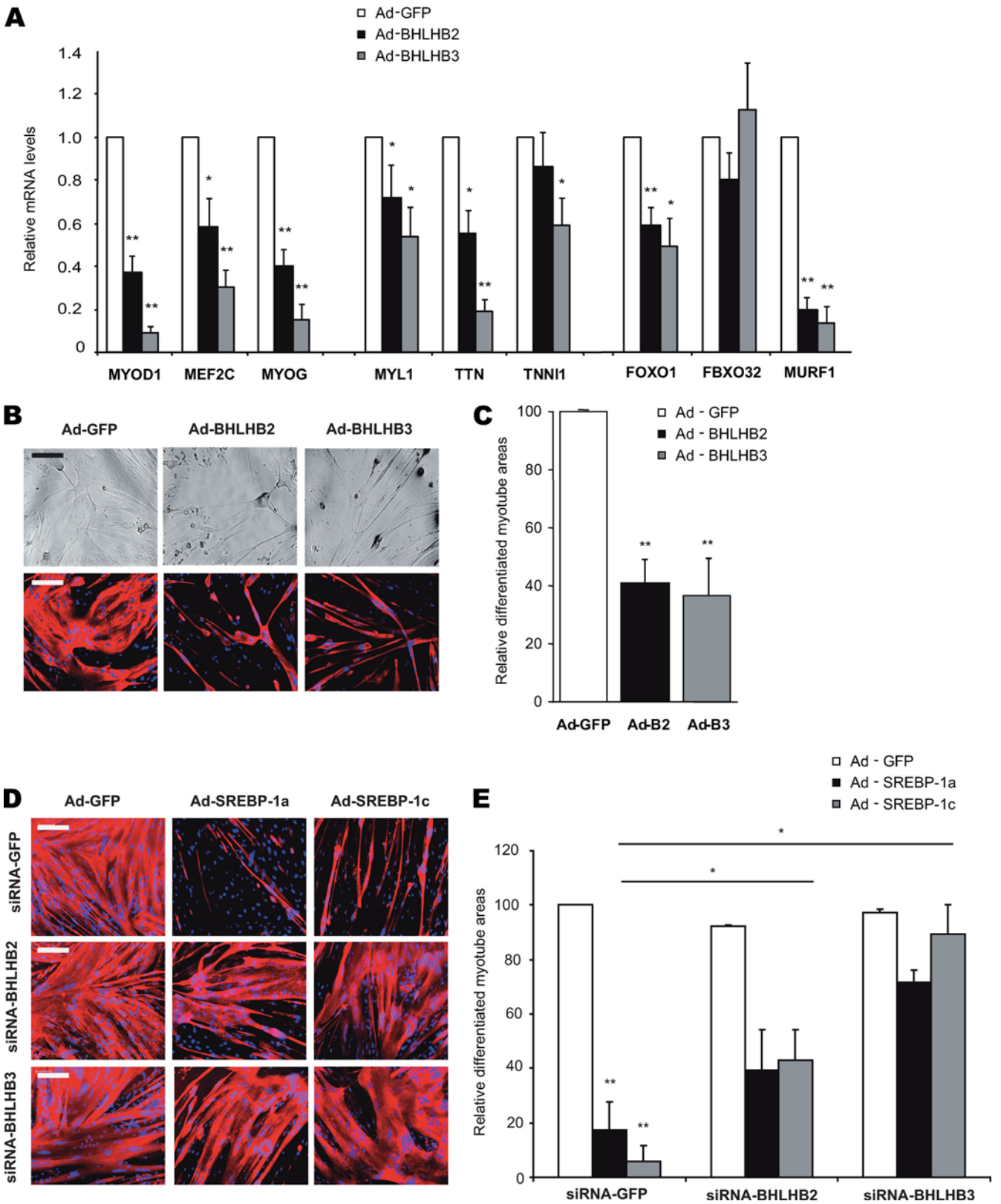


FIG. 7. SREBP-1 induce myotubes atrophy through BHLHB2/B3 repressors. Human myotubes were infected for 48 h with recombinant adenoviruses encoding GFP, BHLHB2, or BHLHB3. (A) mRNA levels of myogenic factors (MYOD1, MEF2C, and MYOG), sarcomeric proteins (MYL1, TNN, and TNNI1), and atrogenic factors (FOXO1, FBXO32, and MURF1). (B) Representative images of myotubes overexpressing GFP, BHLHB2, and BHLHB3. The upper panels show phase-contrast results; the lower panels show immunostaining with TNNI1 antibody (red) and DAPI staining (blue). Scale bar, 100  $\mu$ m. (C) Measurement of the area of myotubes overexpressing GFP, BHLHB2, or BHLHB3 immunostained



proteins. We therefore examined fiber CSA as a function of the fluorescence distribution (Fig. 8E). Although uninfected fibers (lowest fiber fluorescence category) showed similar myofiber CSA means, the reduction in mean fiber CSA of Ad-1a/GFP and Ad-1c/GFP-infected fibers increased with fluorescence intensity, reaching a maximum ca. 20% reduction of mean CSA compared to Ad-GFP-infected fibers.

## DISCUSSION

SREBP-1a and SREBP-1c are bHLH transcription factors first identified as adipocyte determination and differentiation factors (49). Their functions have been extensively studied in hepatocytes and in mouse liver. By activation of specific target genes involved in lipogenesis, SREBP-1 increase triglycerides synthesis, and to a lesser extent cholesterol synthesis (8, 20, 21, 47). SREBP-1c was also shown to mediate the action of insulin on the expression of lipogenic genes in liver (16). SREBP-1 proteins are also expressed in skeletal muscle (13, 38, 39) and in cultured muscle cells (12, 18). In the present study we identified a new role for these transcription factors and demonstrated that both SREBP-1a and SREBP-1c can block myoblast to myotube differentiation, and also induce myotube atrophy *in vitro* and *in vivo*.

The results of the present study also demonstrate that the transcriptional repressors BHLHB2 and BHLHB3 are SREBP-1 target genes and that they mediate the observed SREBP-1 action on human muscle cell. Both BHLHB2 and BHLHB3 have been involved in the regulation of differentiation and growth of several cell types. BHLHB2 promotes the differentiation of trophoblast stem cells to trophoblast giant cells (22), induces neuronal differentiation of pheochromocytoma P19 cell (7) and promotes chondrocyte differentiation of ATDC5 cells (46). BHLHB2 can also block adipocyte differentiation through direct transcriptional repression of PPAR $\gamma$  gene expression (53). Concerning muscle cells, BHLHB2 is expressed in embryonic and adult skeletal muscle cells and has been recently proposed as a possible regulator of satellite cell activation since BHLHB2 knockout mice exhibit increased cellular proliferation and degenerated myotubes during muscle regeneration process (48). BHLHB3 mRNA is expressed in proliferating C2C12 cells and is downregulated during myogenic differentiation (2). Moreover, its overexpression blocks myoblast-to-myotube differentiation in C2C12 cells, through either E-Box occupancy, direct interaction with MYOD1 protein, or both (3).

We have thus demonstrated that both BHLHB2 and BHLHB3 can inhibit muscle cell differentiation and induce myotube atrophy, reproducing the observed SREBP-1 effects in cultured muscle cells, notably a marked decrease in the expression of muscle specific transcription factors and sarcomeric proteins. Furthermore, silencing of BHLHB2

and BHLHB3 protein levels using siRNA fully restored the myogenic differentiation process in the presence of SREBP-1, and rescued, even if not completely, myotubes from atrophy induced by SREBP-1 overexpression. These data therefore establish a novel regulatory pathway of muscle cell differentiation implicating SREBP-1, BHLHB2, and BHLHB3. Interestingly, it is also known that the transcriptional repressors BHLHB2 and BHLHB3 can antagonize each other's effects (3, 32), and the scheme of this novel pathway can be completed with a negative-feedback loop that has recently been described in which both BHLHB2 and BHLHB3 inhibit SREBP-1c expression in a HIF-dependent mechanism (10).

Muscle differentiation is under the control of two families of transcription factors, named MRFs: the myogenic bHLH proteins (i.e., MYF5, MYOD1, MYOG, and MYF6), and the myocyte enhancer factor2 (MEF2) family of MADS domain-containing proteins (i.e., MEF2A, -2B, -2C, and -2D) (5, 40). Moreover, the myogenic bHLH factors interact with MEF2 proteins to cooperatively activate muscle specific genes (36). We have demonstrated here that nuclear accumulation of SREBP-1 proteins led to a coordinated inhibition of the expression of the MRF in myoblasts. This decrease, which results from BHLHB2/B3 transcriptional repressors activation, is sufficient to explain the blockade of differentiation. How BHLHB2/B3 repress the expression of MRF remains to be precisely examined, but this may occur through competitive binding to E-Box on MRF promoters. Moreover, a direct interaction of the transcriptional repressors with MRF proteins may participate in the inhibition of differentiation, as already demonstrated with BHLHB3 and MYOD1 in C2C12 cells (3).

Overexpression of SREBP-1 proteins, and also of BHLHB2/B3, induces both *in vitro* and *in vivo* myotube atrophy. The maintenance of muscle protein content results from intricately regulated anabolic and catabolic pathways. Examining genes regulated by both transcription factors reveals that MRFs and sarcomeric proteins are jointly downregulated, whereas only SREBP-1 induces MURF1, an actor in the proteolytic pathway. The ubiquitin proteasome system has been described as the main regulator of muscle atrophy (30), and the role of MURF1, FBXO32 (atrogen-1), and FOXO1 in this process has been recently reviewed (37). The marked reduction in sarcomeric protein, the induction of myotube atrophy, and the *in vivo* muscle wasting observed in the presence of SREBP-1 proteins could also have resulted from activation of this pathway. Since the reversion of atrophy by BHLHB2/B3 silencing is only partial, a specific action of SREBP-1 proteins on the ubiquitin proteasome system involving other effectors than BHLHB2/B3 might thus be considered. Nevertheless, a significant part of the atrophic effect is due to BHLHB2/B3 action, through inhibition of sarcomeric proteins expression. This decrease in protein synthesis may be due to a direct action of

---

with TNNI1 antibody ( $n = 3$  in each group). The results are presented as means  $\pm$  the SEM. \*,  $P \leq 0.05$ ; \*\*,  $P \leq 0.001$ . (D) Representative images of myotubes overexpressing GFP, SREBP-1a, or SREBP-1c and transfected with siRNA against GFP, BHLHB2, and BHLHB3 for 48 h. Scale bar, 100  $\mu$ m. (E) Measurement of the area of myotubes overexpressing GFP, SREBP-1a, and SREBP-1c and transfected with siRNA against GFP, BHLHB2, or BHLHB3. Myotubes were stained with TNNI1 antibody ( $n = 3$  in each group). The results are presented as means  $\pm$  the SEM. \*,  $P \leq 0.05$ ; \*\*,  $P \leq 0.001$ .

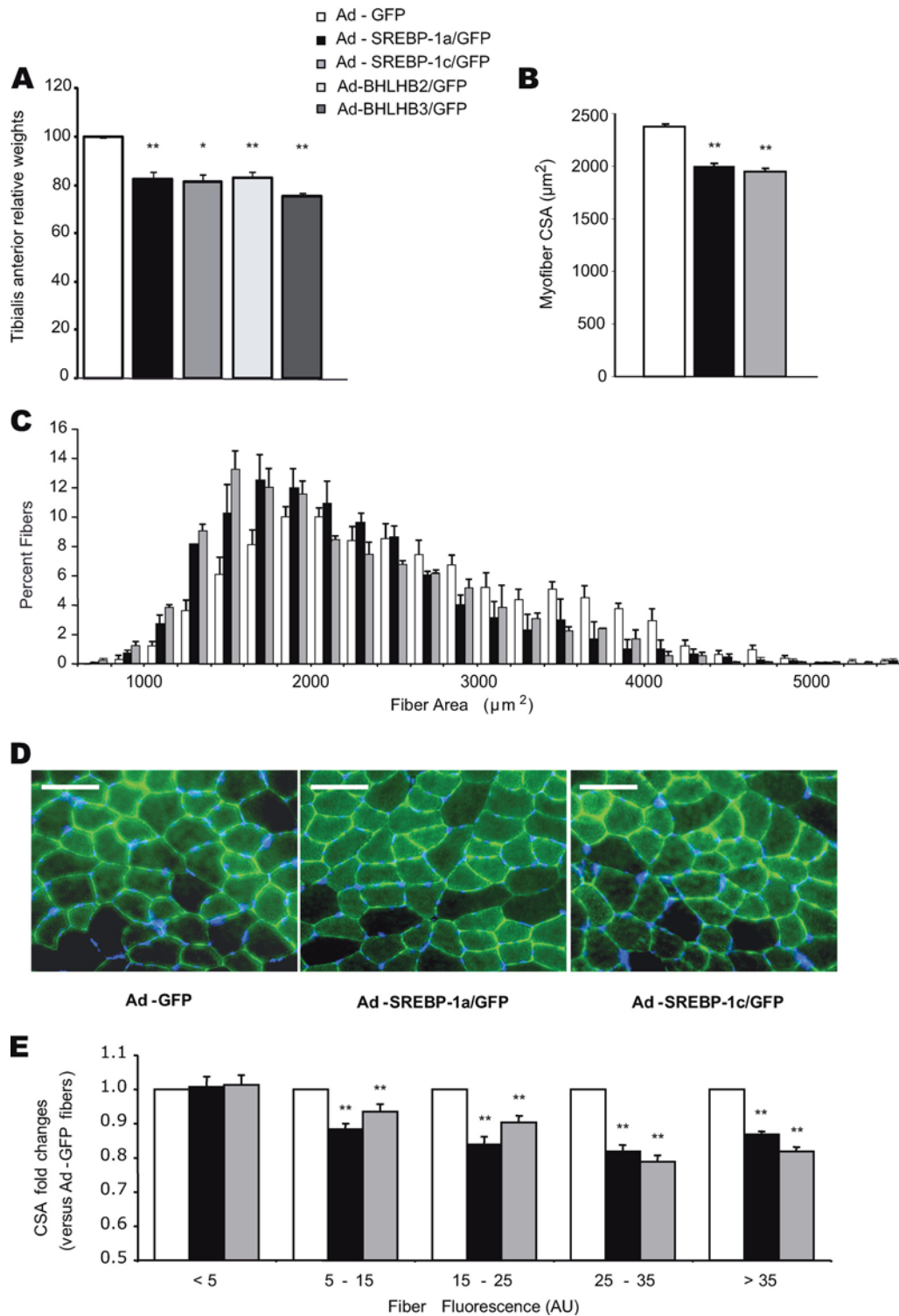


FIG. 8. *In vivo* overexpression of SREBP-1 leads to muscle atrophy. Tibialis anterior (TA) muscles of mice were injected with recombinant adenovirus Ad-GFP, Ad-SREBP-1a/GFP, Ad-SREBP-1c/GFP, Ad-BHLHB2, or Ad-BHLHB3. (A) TA weight 7 days after adenoviral infection ( $n = 7$  in each group). (B) Mean CSA of TA fibers. (C) Distribution of mean CSA of TA muscle fibers ( $n = 4$  in each group). (D) Representative images of TA sections, expressing GFP, or SREBP-1a and GFP, or SREBP-1c and GFP. DAPI staining (blue) and GFP fluorescence (green) are shown. Scale bar, 100  $\mu\text{m}$ . (E) Distribution of CSA of TA muscle fibers as a function of myofiber fluorescence. The results are presented as means  $\pm$  the SEM. \*\*,  $P \leq 0.001$ ; \*\*\*,  $P \leq 0.0001$  ( $n = 4$ ).



BHLHB2/B3 on contractile protein promoters or may also involve the decrease in MRF expression. MRFs are still expressed in differentiated myotubes (50) and participate in the expression of sarcomeric proteins (31). Whether MRFs are involved in the maintenance of the fully differentiated phenotype is still debated, but a combined decrease in MRF expression in differentiated myotubes may affect muscle protein synthesis and thus participate in the observed atrophy. Further studies are needed to characterize this atrophic process in terms of fiber type change, mitochondrial content, and oxidation capacity.

The control of the amount of SREBP-1 proteins in the nucleus involves regulation at several levels, including SREBP-1 gene expression, proteolytic cleavage in the endoplasmic reticulum, nuclear import, and activation/degradation within the nucleus (for a review, see reference 42). It has been recently demonstrated that SREBP-1 expression is enhanced through the PKB/mTOR pathway and could participate in the regulation of cell size through the control of lipid and cholesterol metabolism (41). The inflammatory cytokine tumor necrosis factor alpha, which is known to induce muscle atrophy (33), has been shown to increase SREBP-1 levels in hepatocytes (15). Growth factors such as insulin and IGF-1 are potent inducers of SREBP-1 expression in various cell types and tissues (1, 13, 38). In muscle, SREBP-1c nuclear content can be dramatically increased by insulin through activation of both the PI3K/PKB (38) and the MAPK (28, 38) pathways. Furthermore, the SREBP-1 proteins can control and enhance their own expression in human muscle cells (12). Due to the major and clearly demonstrated role of insulin, growth factors and the PI3K/PKB signaling pathway on muscle development and hypertrophy (23, 29), the atrophic effect of SREBP-1 proteins overexpression demonstrated in the present study likely represents a negative feedback loop to control muscle hypertrophy. In the same context, it is also interesting to notice that SREBP-1a and -1c enhance the expression of the p53 subunit of the PI3K (25, 43), which is regarded as a positive regulator of the PI3K/PKB pathway (17). The SREBP-1 proteins may thus regulate the hypertrophic effects of growth factors not only negatively through induction of the BHLHB2 and BHLHB3 repressors but also positively through the control of PI3K/PKB signaling pathway. Further investigations are required to study the impact of SREBP-1 on signaling pathways in skeletal muscle cells.

In summary, the data presented here identify a new role for the SREBP-1 transcription factors in the regulation of myogenesis and muscle tissue maintenance. Since SREBP-1a and -1c are master regulators of fatty acids and cholesterol synthesis, this new function can justify to consider them as integrators of signals coming from growth factors, inflammation, and nutritional status toward a control of muscle mass. It will therefore be of particular interest to further study these transcription factors in pathological situations inducing muscle wasting, but also in metabolic diseases where abnormalities in SREBP-1 have already been reported such as insulin-resistance and type 2 diabetes.

#### ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by the Programme National de Recherche sur le Diabète (grant to E.L.). V.L. is supported by a doctoral fellowship from the Fondation pour la Recherche Médicale.

We thank Annie Durand, Cyrille Debard, and Aurelie Granjon for technical assistance and E. R. Zabarowsky for the generous gift of the human genomic clone containing the BHLHB2 promoter region.

#### REFERENCES

- Arito, M., T. Horiba, S. Hachimura, J. Inoue, and R. Sato. 2008. Growth factor-induced phosphorylation of sterol regulatory element-binding proteins inhibits sumoylation, thereby stimulating the expression of their target genes, low-density lipoprotein uptake, and lipid synthesis. *J. Biol. Chem.* **283**:15224–15231.
- Azmi, S., A. Ozog, and R. Taneja. 2004. Sharp-1/DEC2 inhibits skeletal muscle differentiation through repression of myogenic transcription factors. *J. Biol. Chem.* **279**:52643–52652.
- Azmi, S., H. Sun, A. Ozog, and R. Taneja. 2003. mSharp-1/DEC2, a basic helix-loop-helix protein functions as a transcriptional repressor of E box activity and Stra13 expression. *J. Biol. Chem.* **278**:20098–20109.
- Azmi, S., and R. Taneja. 2002. Embryonic expression of mSharp-1/mDEC2, which encodes a basic helix-loop-helix transcription factor. *Mech. Dev.* **114**:181–185.
- Black, B. L., and E. N. Olson. 1998. Transcriptional control of muscle development by myocyte enhancer factor-2 (MEF2) proteins. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **14**:167–196.
- Boonsong, T., L. Norton, K. Chokkalingam, K. Jewell, I. Macdonald, A. Bennett, and K. Tsintzas. 2007. Effect of exercise and insulin on SREBP-1c expression in human skeletal muscle: potential roles for the ERK1/2 and Akt signalling pathways. *Biochem. Soc. Trans.* **35**:1310–1311.
- Boudjelal, M., R. Taneja, S. Matsubara, P. Bouillet, P. Dolle, and P. Chambon. 1997. Overexpression of Stra13, a novel retinoic acid-inducible gene of the basic helix-loop-helix family, inhibits mesodermal and promotes neuronal differentiation of P19 cells. *Genes Dev.* **11**:2052–2065.
- Brown, M. S., and J. L. Goldstein. 1997. The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. *Cell* **89**:331–340.
- Chaussade, C., L. Pirola, S. Bonnafous, F. Blondeau, S. Brenz-Verca, H. Tronchere, F. Portis, S. Rusconi, B. Payrastre, J. Laporte, and E. Van Obberghen. 2003. Expression of myotubularin by an adenoviral vector demonstrates its function as a phosphatidylinositol 3-phosphate [PtdIns(3)P] phosphatase in muscle cell lines: involvement of PtdIns(3)P in insulin-stimulated glucose transport. *Mol. Endocrinol.* **17**:2448–2460.
- Choi, S. M., H. J. Cho, H. Cho, K. H. Kim, J. B. Kim, and H. Park. 2008. Stra13/DEC1 and DEC2 inhibit sterol regulatory element binding protein-1c in a hypoxia-inducible factor-dependent mechanism. *Nucleic Acids Res.* **36**:6372–6385.
- Cozzzone, D., C. Debard, N. Dif, N. Ricard, E. Disse, J. Vouillarmet, R. Rabasa-Lhoret, M. Laville, D. Pruneau, J. Rieusset, E. Lefai, and H. Vidal. 2006. Activation of liver X receptors promotes lipid accumulation but does not alter insulin action in human skeletal muscle cells. *Diabetologia* **49**:990–999.
- Dif, N., V. Euthine, E. Gonnat, M. Laville, H. Vidal, and E. Lefai. 2006. Insulin activates human sterol-regulatory-element-binding protein-1c (SREBP-1c) promoter through SRE motifs. *Biochem. J.* **400**:179–188.
- Ducruzeau, P. H., N. Perretti, M. Laville, F. Andreelli, N. Vega, J. P. Riou, and H. Vidal. 2001. Regulation by insulin of gene expression in human skeletal muscle and adipose tissue: evidence for specific defects in type 2 diabetes. *Diabetes* **50**:1134–1142.
- Eberle, D., B. Hegarty, P. Bossard, P. Ferre, and F. Foulle. 2004. SREBP transcription factors: master regulators of lipid homeostasis. *Biochimie* **86**:839–848.
- Endo, M., T. Masaki, M. Seike, and H. Yoshimatsu. 2007. TNF-alpha induces hepatic steatosis in mice by enhancing gene expression of sterol regulatory element binding protein-1c (SREBP-1c). *Exp. Biol. Med.* **232**:614–621.
- Foretz, M., C. Guichard, P. Ferre, and F. Foulle. 1999. Sterol regulatory element binding protein-1c is a major mediator of insulin action on the hepatic expression of glucokinase and lipogenesis-related genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**:12737–12742.
- Fruman, D. A., F. Mauvais-Jarvis, D. A. Pollard, C. M. Yballe, D. Brazil, R. T. Bronson, C. R. Kahn, and L. C. Cantley. 2000. Hypoglycaemia, liver necrosis and perinatal death in mice lacking all isoforms of phosphoinositide 3-kinase p85 alpha. *Nat. Genet.* **26**:379–382.
- Guillet-Deniau, L., V. Mieulet, S. Le Lay, Y. Achouri, D. Carre, J. Girard, F. Foulle, and P. Ferre. 2002. Sterol regulatory element binding protein-1c expression and action in rat muscles: insulin-like effects on the control of glycolytic and lipogenic enzymes and UCP3 gene expression. *Diabetes* **51**:1722–1728.
- Honma, S., T. Kawamoto, Y. Takagi, K. Fujimoto, F. Sato, M. Noshiro, Y. Kato, and K. Honma. 2002. Dec1 and Dec2 are regulators of the mammalian molecular clock. *Nature* **419**:841–844.
- Horton, J. D., J. L. Goldstein, and M. S. Brown. 2002. SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J. Clin. Invest.* **109**:1125–1131.
- Horton, J. D., N. A. Shah, J. A. Warrington, N. N. Anderson, S. W. Park, M. S. Brown, and J. L. Goldstein. 2003. Combined analysis of oligonucleotide microarray data from transgenic and knockout mice identifies direct SREBP target genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**:12027–12032.

22. Hughes, M., N. Dobric, I. C. Scott, L. Su, M. Starovic, B. St-Pierre, S. E. Egan, J. C. Kingdom, and J. C. Cross. 2004. The Hand1, Stra13 and Gcm1 transcription factors override FGF signaling to promote terminal differentiation of trophoblast stem cells. *Dev. Biol.* **271**:26–37.
23. Izumiya, Y., T. Hopkins, C. Morris, K. Sato, L. Zeng, J. Viereck, J. A. Hamilton, N. Ouchi, N. K. LeBrasseur, and K. Walsh. 2008. Fast/glycolytic muscle fiber growth reduces fat mass and improves metabolic parameters in obese mice. *Cell Metab.* **7**:159–172.
24. Janatpour, M. J., M. F. Utset, J. C. Cross, J. Rossant, J. Dong, M. A. Israel, and S. J. Fisher. 1999. A repertoire of differentially expressed transcription factors that offers insight into mechanisms of human cytotrophoblast differentiation. *Dev. Genet.* **25**:146–157.
25. Kallin, A., L. E. Johannessen, P. D. Cani, C. Y. Marbehant, A. Essaghir, F. Fougelle, P. Ferre, C. H. Heldin, N. M. Delzenne, and J. B. Demoulin. 2007. SREBP-1 regulates the expression of heme oxygenase 1 and the phosphatidylinositol-3 kinase regulatory subunit p55 gamma. *J. Lipid Res.* **48**:1628–1636.
26. Kim, D. G., H. M. Kang, S. K. Jang, and H. S. Shin. 1992. Construction of a bifunctional mRNA in the mouse by using the internal ribosomal entry site of the encephalomyocarditis virus. *Mol. Cell. Biol.* **12**:3636–3643.
27. Kim, J. B., and B. M. Spiegelman. 1996. ADD1/SREBP1 promotes adipocyte differentiation and gene expression linked to fatty acid metabolism. *Genes Dev.* **10**:1096–1107.
28. Kotzka, J., D. Muller-Wieland, G. Roth, L. Kremer, M. Munck, S. Schurmann, B. Knebel, and W. Krone. 2000. Sterol regulatory element binding proteins (SREBP)-1a and SREBP-2 are linked to the MAP-kinase cascade. *J. Lipid Res.* **41**:99–108.
29. Lai, K. M., M. Gonzalez, W. T. Poueymirou, W. O. Kline, E. Na, E. Zlotchenko, T. N. Stitt, A. N. Economides, G. D. Yancopoulos, and D. J. Glass. 2004. Conditional activation of akt in adult skeletal muscle induces rapid hypertrophy. *Mol. Cell. Biol.* **24**:9295–9304.
30. Lecker, S. H., V. Solomon, W. E. Mitch, and A. L. Goldberg. 1999. Muscle protein breakdown and the critical role of the ubiquitin-proteasome pathway in normal and disease states. *J. Nutr.* **129**:227S–237S.
31. Li, H., and Y. Capetanaki. 1993. Regulation of the mouse desmin gene: transactivated by MyoD, myogenin, MRF4 and Myf5. *Nucleic Acids Res.* **21**:335–343.
32. Li, Y., M. Xie, X. Song, S. Gragen, K. Sachdeva, Y. Wan, and B. Yan. 2003. DEC1 negatively regulates the expression of DEC2 through binding to the E-box in the proximal promoter. *J. Biol. Chem.* **278**:16899–16907.
33. Li, Y. P., and M. B. Reid. 2000. NF- $\kappa$ B mediates the protein loss induced by TNF-alpha in differentiated skeletal muscle myotubes. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **279**:R1165–R1170.
34. MacLean, H. E., and H. M. Kronenberg. 2004. Expression of Stra13 during mouse endochondral bone development. *Gene Expr. Patterns* **4**:633–636.
35. Miyazaki, K., T. Kawamoto, K. Tanimoto, M. Nishiyama, H. Honda, and Y. Kato. 2002. Identification of functional hypoxia response elements in the promoter region of the DEC1 and DEC2 genes. *J. Biol. Chem.* **277**:47014–47021.
36. Molkentin, J. D., B. L. Black, J. F. Martin, and E. N. Olson. 1995. Cooperative activation of muscle gene expression by MEF2 and myogenic bHLH proteins. *Cell* **83**:1125–1136.
37. Murton, A. J., D. Constantin, and P. L. Greenhaff. 2008. The involvement of the ubiquitin proteasome system in human skeletal muscle remodeling and atrophy. *Biochim. Biophys. Acta* **1782**:730–743.
38. Nadeau, K. J., J. W. Leitner, I. Gurerich, and B. Draznin. 2004. Insulin regulation of sterol regulatory element-binding protein-1 expression in L-6 muscle cells and 3T3 L1 adipocytes. *J. Biol. Chem.* **279**:34380–34387.
39. Osborne, T. F. 2000. Sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs): key regulators of nutritional homeostasis and insulin action. *J. Biol. Chem.* **275**:32379–32382.
40. Parker, M. H., P. Seale, and M. A. Rudnicki. 2003. Looking back to the embryo: defining transcriptional networks in adult myogenesis. *Nat. Rev. Genet.* **4**:497–507.
41. Porstmann, T., C. R. Santos, B. Griffiths, M. Cully, M. Wu, S. Leever, J. R. Griffiths, Y. L. Chung, and A. Schulze. 2008. SREBP activity is regulated by mTORC1 and contributes to Akt-dependent cell growth. *Cell Metab.* **8**:224–236.
42. Raghov, R., C. Yellaturu, X. Deng, E. A. Park, and M. B. Elam. 2008. SREBPs: the crossroads of physiological and pathological lipid homeostasis. *Trends Endocrinol. Metab.* **19**:65–73.
43. Rome, S., V. Lecomte, E. Meugnier, J. Rieusset, C. Debard, V. Euthine, H. Vidal, and E. Lefai. 2008. Microarray analyses of SREBP-1a and SREBP-1c target genes identify new regulatory pathways in muscle. *Physiol. Genomics* **34**:327–337.
44. Rossner, M. J., J. Dorr, P. Gass, M. H. Schwab, and K. A. Nave. 1997. SHARPs: mammalian enhancer-of-split- and hairy-related proteins coupled to neuronal stimulation. *Mol. Cell Neurosci.* **9**:460–475.
45. Sapru, M. K., K. M. McCormick, and B. Thimmapaya. 2002. High-efficiency adenovirus-mediated in vivo gene transfer into neonatal and adult rodent skeletal muscle. *J. Neurosci. Methods* **114**:99–106.
46. Shen, M., E. Yoshida, W. Yan, T. Kawamoto, K. Suardita, Y. Koyano, K. Fujimoto, M. Noshiro, and Y. Kato. 2002. Basic helix-loop-helix protein DEC1 promotes chondrocyte differentiation at the early and terminal stages. *J. Biol. Chem.* **277**:50112–50120.
47. Shimano, H., J. D. Horton, R. E. Hammer, I. Shimomura, M. S. Brown, and J. L. Goldstein. 1996. Overproduction of cholesterol and fatty acids causes massive liver enlargement in transgenic mice expressing truncated SREBP-1a. *J. Clin. Invest.* **98**:1575–1584.
48. Sun, H., L. Li, C. Vercherat, N. T. Gulbagci, S. Acharjee, J. Li, T. K. Chung, T. H. Thin, and R. Taneja. 2007. Stra13 regulates satellite cell activation by antagonizing Notch signaling. *J. Cell Biol.* **177**:647–657.
49. Tontonoz, P., J. B. Kim, R. A. Graves, and B. M. Spiegelman. 1993. ADD1: a novel helix-loop-helix transcription factor associated with adipocyte determination and differentiation. *Mol. Cell. Biol.* **13**:4753–4759.
50. Walters, E. H., N. C. Stickland, and P. T. Loughna. 2000. The expression of the myogenic regulatory factors in denervated and normal muscles of different phenotypes. *J. Muscle Res. Cell Motil.* **21**:647–653.
51. Yamada, K., and K. Miyamoto. 2005. Basic helix-loop-helix transcription factors, BHLHB2 and BHLHB3; their gene expressions are regulated by multiple extracellular stimuli. *Front. Biosci.* **10**:3151–3171.
52. Yokoyama, C., X. Wang, M. R. Briggs, A. Admon, J. Wu, X. Hua, J. L. Goldstein, and M. S. Brown. 1993. SREBP-1, a basic-helix-loop-helix-leucine zipper protein that controls transcription of the low density lipoprotein receptor gene. *Cell* **75**:187–197.
53. Yun, Z., H. L. Maecker, R. S. Johnson, and A. J. Giaccia. 2002. Inhibition of PPAR gamma 2 gene expression by the HIF-1-regulated gene DEC1/Stra13: a mechanism for regulation of adipogenesis by hypoxia. *Dev. Cell* **2**:331–341.



## Discussion

Cette étude met en lumière un nouveau rôle pour les facteurs de transcription SREBP-1 dans le muscle squelettique. Nous montrons que SREBP-1a et SREBP-1c induisent une atrophie musculaire, *in vitro*, sur des myotubes humains en culture primaire, comme *in vivo*, sur le muscle de souris surexprimant SREBP-1, et bloquent la différenciation de myoblastes en myotubes. L'inhibition de l'expression de BHLHB2 et BHLHB3 par ARN interférence reversant ces effets de SREBP-1, nous démontrons que ces répresseurs transcriptionnels sont les effecteurs des effets de SREBP-1a et SREBP-1c sur la différenciation des cellules musculaires et leur atrophie. Ceci écarte l'intervention de la synthèse lipidique induite par SREBP-1 dans cette nouvelle fonction.

La différenciation musculaire est sous le contrôle de deux familles de facteurs de transcription : les MRF, MyoD, Myf5, MRF4 et la myogénine, et les protéines MEF2 appartenant à la famille des protéines MADS (Molkentin and Olson 1996a). Les MRF interagissent avec les protéines MEF2, notamment MEF2C, pour induire l'expression des gènes muscle-spécifiques. Nos résultats montrent que l'accumulation nucléaire de SREBP-1 conduit à l'inhibition coordonnée des MRF et de MEF2C dans les myoblastes et les myotubes. La répression de l'expression des MRF explique le blocage de la différenciation des myoblastes par SREBP-1. Cette répression pourrait également être en à l'origine de l'effet atrophique de SREBP-1 sur les myotubes.

D'autre part, l'étude de leurs promoteurs révèle que les gènes codant pour les répresseurs transcriptionnels BHLHB2 et BHLHB3 sont des cibles directes de SREBP-1a et SREBP-1c. Surtout, BHLHB2 et BHLHB3 apparaissent comme les médiateurs des effets répresseurs de SREBP-1 sur les cellules musculaires. En effet, l'analyse transcriptomique de myotubes surexprimant BHLHB2 et BHLHB3 montre que 36% des gènes muscle-spécifiques régulés au cours de la surexpression de SREBP-1, sont inhibés par BHLHB2 ou BHLHB3. BHLHB2 et BHLHB3 ont tout deux été décrits dans la régulation de la différenciation et de la croissance de nombreux types cellulaires. BHLHB2 active la différenciation des trophoblastes, la différenciation neuronale des cellules P12 et la différenciation des chondrocytes (Boudjelal *et al.* 1997; Shen *et al.* 2002; Hughes *et al.* 2004). Il peut également inhiber la différenciation adipocytaire en réprimant directement l'expression de PPAR $\gamma$  (Yun *et al.* 2002). BHLHB2 est exprimé également dans les cellules musculaires embryonnaires et

dans le muscle squelettique adulte. Récemment, un rôle potentiel pour BHLHB2 dans la différenciation des cellules satellites à été proposé, les souris KO-BHLHB2 présentant une prolifération non contrôlée des cellules satellites et des myotubes dégénérés au cours du processus de régénération musculaire (Sun *et al.* 2007a). BHLHB3 est exprimé dans les cellules C2C12 en prolifération mais son expression diminue lors de la différenciation myogénique (Azmi *et al.* 2003). De plus, sa surexpression bloque la différenciation des cellules C2C12 en myotubes, en interférant avec l'activité transcriptionnelle de MyoD, soit par interaction protéique directe soit par liaison sur les E-Box (Azmi *et al.* 2004).

Nous remarquons également une forte expression de BHLHB2 et BHLHB3 dans les myoblastes en culture, qui diminue ensuite dans les myotubes au cours de la différenciation. Le travail présenté ici montre que BHLHB2 et BHLHB3 peuvent tous deux inhiber la différenciation myogénique et induire l'atrophie *in vitro*, reproduisant ainsi les effets de SREBP-1 sur les myoblastes et les myotubes. Comme SREBP-1, BHLHB2 et BHLHB3 induisent une inhibition marquée de l'expression des MRF et de MEF2C. De plus, l'inhibition de l'expression de BHLHB2 et BHLHB3 par la technique d'ARN interférence restaure la différenciation des myoblastes en myotubes, et ce en présence de SREBP-1. Ces données confirment la mise en évidence d'une nouvelle voie de régulation de la différenciation cellulaire musculaire passant par l'activation de SREBP-1 stimulant l'expression de BHLHB2 et BHLHB3, conduisant à l'inhibition de l'expression des gènes muscle-spécifiques. A cette nouvelle voie de régulation s'ajoute un possible rétrocontrôle, BHLHB2 et BHLHB3 pouvant chacun réprimer les effets de l'autre et inhiber l'expression de SREBP-1 (St-Pierre *et al.* 2002; Li *et al.* 2003; Choi *et al.* 2008).

Le maintien de la masse musculaire adulte résulte d'un équilibre finement régulé entre synthèse et dégradation protéique (Sandri 2008). Le système ubiquitine-protéasome a été décrit comme le principal régulateur de l'atrophie musculaire, de concert avec les atrogènes MuRF1 et Atrogine-1, tous deux régulés par l'activité transcriptionnelle de FOXO1 (Murton *et al.* 2008). La réduction du contenu en protéines sarcomériques, l'induction *in vitro* de l'atrophie des myotubes et la fonte musculaire observée *in vivo* chez la souris, provoquées par la surexpression de SREBP-1, pourraient résulter de l'activation de cette voie de régulation de l'atrophie. Cependant l'expression de FOXO1 n'apparaît pas affectée par la surexpression de SREBP-1 dans les myotubes en culture. Nous ne pouvons toutefois pas exclure une modification de son activité par phosphorylation. Par contre, nous observons que SREBP-1, mais pas BHLHB2, ni BHLHB3, induit une forte augmentation de l'expression de MuRF1.

SREBP-1 pourrait donc avoir une action spécifique sur le processus de régulation de l'atrophie musculaire. D'autre part, l'expression des atrogènes peut également être modulée par les facteurs de la famille NFκB (Cai *et al.* 2004; Judge *et al.* 2007). L'éventuelle activation de NFκB par SREBP-1 est en cours d'étude au laboratoire.

L'activation de SREBP-1 implique plusieurs niveaux de régulation, incluant l'expression génique, le clivage protéolytique du précurseur, le transport nucléaire de la forme mature, et le contrôle de son activité transcriptionnelle dans le noyau cellulaire (Raghow *et al.* 2008). Les facteurs de croissance comme l'insuline et IGF-1 ont été décrits comme de puissants activateurs de SREBP-1 dans différents types cellulaires (Arito *et al.* 2008; Shimano 2009). Dans le muscle, la maturation de SREBP-1 est fortement stimulée par l'insuline, via l'activation à la fois de la voie PI3Kinase/PKB et de la voie des MAPKinases (Kotzka *et al.* 2000; Nadeau *et al.* 2004). SREBP-1 lui-même participe à l'activation de cette voie en augmentant l'expression de la sous-unité p55 de la PI3Kinase, régulateur de la voie PI3K/PKB (Kallin *et al.* 2007; Rome *et al.* 2008). Le rôle de l'insuline et des facteurs de croissance dans le développement de l'hypertrophie musculaire a été clairement démontré (Philippou *et al.* 2007; Velloso 2008). Ainsi, l'effet atrophique de SREBP-1 pourrait participer à un rétrocontrôle négatif venant réguler l'hypertrophie induite par les facteurs de croissance.

Les données présentées dans cette étude décrivent un nouveau rôle pour les facteurs SREBP-1 dans la régulation de la myogenèse et le maintien de la masse musculaire. SREBP-1a et SREBP-1c étant des régulateurs majeurs du métabolisme glucido-lipidique, ils peuvent ainsi intégrer les signaux métaboliques et nutritionnels dans le contrôle de la fonction musculaire. En tant que médiateurs des effets de l'insuline dans le muscle, ils sont une des principales cibles de l'insulino-résistance musculaire au cours du diabète de type 2 et de l'obésité, pathologies pouvant s'accompagner d'altérations de la fonction musculaire. SREBP-1 et leurs cibles, les répresseurs transcriptionnels BHLHB2 et BHLHB3, pourraient donc être impliqués dans le développement de ces pathologies, et la survenue des altérations musculaires qui leur sont associées.



## Article n° 3

**L'analyse transcriptomique de muscles squelettiques de patients diabétiques de types 2 révèle l'implication du facteur BHLHB2 dans l'insulino-résistance musculaire.**

Microarray analysis of genes with impaired insulin regulation in the skeletal muscle of type 2 diabetic patients indicates the involvement of basic helix-loop-helix domain-containing, class B, 2 protein (BHLHB2). *Diabetologia*

*Sophie Rome, Emmanuelle Meugnier, Virginie Lecomte, Jennifer Rieusset, Vanessa Berbe-Euthine, Jérémy Besson, Catherine Cerruti, Sandra Pesanti, Aurélie Granjon, Emmanuelle Disse, Karine Clément, Etienne Lefai, Martine Laville et Hubert Vidal.*





## Introduction

Les facteurs SREBP-1 sont considérés comme les médiateurs principaux des effets transcriptionnels de l'insuline sur le muscle squelettique. L'insuline est une hormone pléiotropique exerçant ses effets non seulement sur le métabolisme mais également sur plusieurs processus cellulaires dont la croissance, la différenciation ou l'apoptose. L'action de l'insuline est initiée par sa fixation à son récepteur spécifique à activité tyrosine kinase, conduisant à l'activation de la voie métabolique PI3Kinase/PKB et mitogénique des MAPKinases. L'insuline agit en modulant l'activité et/ou la localisation cellulaire d'enzymes clés par des mécanismes rapides de phosphorylation/déphosphorylation. De manière complémentaire, l'insuline agit à plus long terme en modulant l'expression d'un grand nombre de gènes (Wu *et al.* 2007). Une précédente étude réalisée au laboratoire montre que l'insuline régule plus de 800 gènes dans le muscle squelettique humain (Rome *et al.* 2003). Cette action transcriptionnelle de l'insuline est cruciale pour permettre à l'organisme de s'adapter aux variations métaboliques et environnementales. L'hypothèse est faite au laboratoire que l'insulino-résistance du diabète de type 2 serait la conséquence d'un défaut d'adaptation du métabolisme à l'environnement. De fait, l'expression de gènes majeurs impliqués dans l'action de l'insuline et le métabolisme du glucose est altérée chez le patient DT2 (O'Brien and Granner 1996).

Il est reconnu que les effets transcriptionnels de l'insuline sont réalisés par régulation de l'expression, de l'activité ou de la localisation de facteurs de transcription. En comparaison du très grand nombre de gènes régulés par l'insuline, les facteurs de transcription identifiés comme cibles de l'insuline sont encore très peu nombreux. Parmi eux, SREBP-1c est celui dont le rôle dans l'action transcriptionnelle de l'insuline est le mieux décrit (Raghow *et al.* 2008). L'insuline active SREBP-1c à la fois en augmentant son expression génique et en favorisant sa maturation et la libération de la forme nucléaire mature (Ducluzeau *et al.* 2001; Yellaturu *et al.* 2009). Plusieurs études ont montré l'implication dans le muscle squelettique du facteur SREBP-1c dans la régulation de gènes cibles de l'insuline comme *FAS*, *HKII*, ou *ACC* (Foretz *et al.* 1999a; Joseph *et al.* 2002; Gosmain *et al.* 2004). La réponse de SREBP-1c à l'insuline est altérée dans le muscle de patients diabétiques de type 2 (Ducluzeau *et al.* 2001). D'autres facteurs de transcription ont été décrits pour participer aux effets transcriptionnels de l'insuline. Le facteur IRE-BP1, Insulin-response element binding protein 1, voit son expression augmentée et s'accumule dans le noyau cellulaire en présence

d'insuline (Chahal *et al.* 2008). Le facteur FOXO1, quant à lui, est exclu du noyau lors d'une stimulation par l'insuline, induisant la répression de l'expression de certains gènes en réponse à l'insuline (Barthel *et al.* 2005).

L'insuline coordonne donc un programme complexe de modulation transcriptionnelle, représentant les bases moléculaires de son action. La caractérisation de l'ensemble des acteurs de ce programme se révèle nécessaire à la compréhension des mécanismes de l'insulino-résistance et au développement de futures thérapeutiques pour le DT2. Afin de progresser dans l'identification des acteurs moléculaires de la réponse à l'insuline, nous avons comparé les effets transcriptionnels de l'insuline dans le muscle squelettique de patients DT2 insulino-résistants et de sujets sains au cours d'un clamp hyperinsulinémique-euglycémique de 3h. Une analyse transcriptomique a conduit à l'identification de 30 facteurs de transcription dont la réponse à l'insuline était altérée chez les patients DT2. Parmi eux apparaît BHLHB2, que nos précédents travaux ont désigné comme une cible directe de SREBP-1 (article n°2). Une récente étude montre que son expression, comme celle de SREBP-1c, est induite par l'insuline dans le muscle squelettique humain (Coletta *et al.* 2008). Nos résultats indiquent que, de même, son expression est altérée dans le muscle de patients DT2 (Rome *et al.* 2003).

Ces résultats nous ont conduits à étudier le rôle du répresseur transcriptionnel BHLHB2, cible de SREBP-1, dans la médiation des effets transcriptionnels de l'insuline au sein du muscle squelettique et son implication dans les mécanismes de l'insulino-résistance musculaire au cours du DT2.

Dans un premier temps, nous avons réalisé une analyse transcriptomique d'échantillons de muscle prélevés sur des sujets sains et des patients DT2, avant et après un clamp hyperinsulinémique-euglycémique de trois heures, afin de déterminer quels étaient les gènes dont la réponse à l'insuline est altérée dans le muscle squelettique de patients DT2. Parmi ces gènes, nous nous sommes particulièrement intéressés aux facteurs de transcription qui n'étaient plus régulés par l'insuline chez les patients DT2. Par analyse bioinformatique des promoteurs des gènes codant pour ces facteurs, nous avons cherché par quels intermédiaires l'insuline contrôlait l'expression de ces facteurs de transcription et ainsi identifié le répresseur BHLHB2.

Afin de déterminer dans quelle mesure BHLHB2 participait à la régulation transcriptionnelle initiée par l'insuline, nous avons utilisé les données issues de l'analyse transcriptomique de myotubes surexprimant BHLHB2, réalisée dans le cadre de l'article n°2,

pour déterminer les gènes cibles directes de BHLHB2. Nous avons ensuite croisé ces données avec l'ensemble des gènes régulés par l'insuline chez le sujet sain (Rome *et al.* 2003).



# Microarray analysis of genes with impaired insulin regulation in the skeletal muscle of type 2 diabetic patients indicates the involvement of basic helix-loop-helix domain-containing, class B, 2 protein (BHLHB2)

S. Rome · E. Meugnier · V. Lecomte · V. Berbe ·  
J. Besson · C. Cerutti · S. Pesenti · A. Granjon ·  
E. Disse · K. Clement · E. Lefai · M. Laville · H. Vidal

Received: 7 May 2009 / Accepted: 5 June 2009 / Published online: 10 July 2009  
© Springer-Verlag 2009

## Abstract

**Aims/hypothesis** One of the major processes by which insulin exerts its multiple biological actions is through gene expression regulation. Thus, the identification of transcription factors affected by insulin in target tissues represents an important challenge. The aim of the present study was to gain a greater insight into this issue through

the identification of transcription factor genes with insulin-regulated expression in human skeletal muscle.

**Methods** Using microarray analysis, we defined the sets of genes modulated during a 3 h hyperinsulinaemic–euglycaemic clamp ( $2 \text{ mU min}^{-1} \text{ kg}^{-1}$ ) in the skeletal muscle of insulin-sensitive control volunteers and in moderately obese insulin-resistant type 2 diabetic patients.

**Results** Of the 1,529 and 1,499 genes regulated during the clamp in control and diabetic volunteers, respectively, we identified 30 transcription factors with impaired insulin-regulation in type 2 diabetic patients. Analysis of the promoters of the genes encoding these factors revealed a possible contribution of the transcriptional repressor basic helix-loop-helix domain-containing, class B, 2 protein (BHLHB2), insulin regulation of which is strongly altered in the muscle of diabetic patients. Gene ontology analysis of BHLHB2 target genes, identified after *BHLHB2* over-expression in human primary myotubes, demonstrated that about 10% of the genes regulated in vivo during hyperinsulinaemia are potentially under the control of this repressor. The data also suggested that BHLHB2 is situated at the crossroads of a complex transcriptional network that is able to modulate major metabolic and biological pathways in skeletal muscle, including the regulation of a cluster of genes involved in muscle development and contraction.

**Conclusions/interpretation** We have identified BHLHB2 as a potential novel mediator of insulin transcriptional action in human skeletal muscle.

**Keywords** BHLHB2 · Hyperinsulinaemic–euglycaemic clamp · Insulin · Skeletal muscle · Transcription factors · Transcription network · Type 2 diabetes

**Electronic supplementary material** The online version of this article (doi:10.1007/s00125-009-1442-4) contains supplementary material, which is available to authorised users.

S. Rome (✉) · E. Meugnier · V. Lecomte · V. Berbe · J. Besson ·  
S. Pesenti · A. Granjon · E. Lefai · H. Vidal  
INRA 1235, INSERM 870, INSA-Lyon,  
Régulations Métaboliques Nutrition et Diabète, Université de Lyon,  
Oullins 69600, France  
e-mail: srome@univ-lyon1.fr

C. Cerutti  
INSERM ERI22/EA 4173, Biostatistiques, Université Lyon,  
Lyon 69008, France

E. Disse · M. Laville  
Hospices Civils de Lyon, Service de Diabétologie et Nutrition,  
Hôpital Edouard-Herriot,  
Lyon 69008, France

M. Laville · H. Vidal  
Centre de Recherche en Nutrition Humaine Rhône-Alpes,  
Oullins 69600, France

K. Clement  
Département Nutrition-Métabolisme-Différenciation,  
INSERM 872, Centre de Recherche des Cordeliers,  
Paris 75006, France

## Abbreviations

BHLHB2	Basic helix-loop-helix domain-containing, class B, 2
CHRE	Carbohydrate response element
GFP	Green fluorescent protein
PI3-kinase	Phosphatidylinositol 3-kinase
SREBP-1c	Sterol regulatory element-binding transcription factor 1c

## Introduction

Insulin is a pleiotropic hormone that exerts major effects on metabolism and cellular processes, including growth, differentiation and apoptosis. These effects are initiated by specific binding to tyrosine kinase cell surface receptors, which then activate both a metabolic signalling pathway through phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-kinase) and a mitogenic pathway through the Ras/mitogen-activated protein kinase cascade [1]. Insulin actions largely result from changes in the activity of enzymes through phosphorylation/dephosphorylation, but it also has major effects through the regulation of a complex pattern of gene expression [2–6]. Up to now, attempts to find a consensus insulin-response element in the promoter sequences of insulin-regulated genes have failed [6], and it is accepted that the effects of insulin on transcription are mediated through the regulation of numerous transcription factors, either by stimulating the transcription of the genes encoding these factors and/or by modifying their cellular location. For instance, sterol regulatory element-binding transcription factor 1c (SREBP-1c) is induced at the mRNA level but also activated by proteolytic cleavage and translocation to the nucleus [7]. Similarly, insulin-response element binding protein-1 (IRE-BP1) is upregulated at the transcriptional level and accumulates in the nucleus in the presence of insulin [8]. These transcription factors have been implicated in the stimulation of gene transcription by insulin. On the other hand, insulin signalling to FoxO1 has been shown to contribute to the repression of gene expression as the result of its nuclear exclusion following insulin stimulation [9].

Despite the fact that insulin modulates the expression of thousands of genes in its target tissues [2–6], very few transcription factors have been described as mediators of insulin action, and the global insulin gene transcription network is far from being completely resolved. To overcome the limitations of classical approaches based on promoter sequence analysis to retrieve potential consensus binding sites in sets of co-regulated genes, a complementary strategy is the consideration of pathological situations in which insulin action is altered, such as in insulin-resistance associated with type 2 diabetes. Indeed, a large

body of evidence indicates that the transcriptional action of insulin is impaired in insulin resistance [6], and several genes with altered responses to insulin have been identified in the skeletal muscle of type 2 diabetic patients [10–12]. Comparisons of sets of genes with differential regulation between insulin-resistant and insulin-sensitive individuals should thus permit the identification of new key regulatory factors.

Expression profiling is one strategy that can be used to identify sets of genes with altered regulation in response to insulin. Such an approach has been successfully used to identify a cluster of genes with reduced expression levels in the skeletal muscle of type 2 diabetic individuals [13, 14]. Because these genes were collectively involved in the same pathway of oxidative phosphorylation, it was possible to identify common regulatory partners, such as peroxisome proliferator-activated receptor coactivator-1 $\alpha$  (PGC1 $\alpha$ ) and nuclear respiratory factor-1 [13, 14]. However, the volunteers were analysed either in the basal state [13] or after a hyperinsulinaemic clamp [14] only, and so it was not possible to draw any conclusions as to whether the defects in regulation were due to insulin.

We designed the present study to compare the transcriptional effects of insulin in the skeletal muscle of moderately obese insulin-resistant type 2 diabetic patients and age-matched insulin-sensitive volunteers during a 3 h hyperinsulinaemic–euglycaemic clamp [3]. This approach led to the identification of 30 transcription factors with defective regulation by insulin in the muscle of diabetic patients. Among them, special attention was devoted to basic helix-loop-helix domain-containing, class B, two protein (BHLHB2; also known as DEC1, SHARP-2 and STRA13) a member of the DEC subfamily of basic helix-loop-helix (bHLH) proteins, which are known to play pivotal roles in multiple pathways [15]. By using a bioinformatic approach, we characterised the role of this factor in the transcriptional action of insulin and in its defective action in the muscle of type 2 diabetic patients.

## Methods

*Volunteers and study design* All volunteers gave their written consent after being informed of the possible risks of the study, and the protocol was approved by the ethics committee of Hospices Civils de Lyon (Lyon, France). None of the controls had a familial or personal history of diabetes, obesity, dyslipidaemia or hypertension. All the moderately obese type 2 diabetic patients (HbA<sub>1c</sub> 7.1 $\pm$ 0.3%, duration of diabetes 7 $\pm$ 1 years) were taking metformin as the only oral hyperglycaemic agent. Because metformin treatment did not normalise insulin sensitivity, as estimated by insulin-induced whole body glucose utilisation

tion, the treatment was not stopped before the study. After an overnight fast, all volunteers were subjected to a 3 h euglycaemic–hyperinsulinaemic clamp [16]. Metabolic variables are presented in Table 1. Percutaneous biopsies of the vastus lateralis muscle were taken under local anaesthesia before and after insulin infusion.

**Total RNA extraction from muscle samples and microarray analysis** Frozen muscle samples were ground in liquid nitrogen, and total RNA was extracted using the classical guanidinium thiocyanate method [16]. The mean yield of total RNA ( $0.29 \pm 2 \mu\text{g}/\text{mg}$  of muscle [wet weight]) was not different between groups. Muscle RNA samples were hybridised on cDNA microarrays from the Stanford Functional Genomics Facility (<http://www.microarray.org/sfgf>). The same volunteers were analysed before and after the clamp by using two-colour microarrays [3]. The data sets are available from the GEO database (GSE 11868 and GSE 12844; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>, accessed 1 January 2009).

Signal intensities were logarithmically ( $\log_e$ ) transformed, and normalisation was performed by intensity-dependent Lowess method. To compare results from the different experiments, data from each slide were normalised in log space to have a mean of 0 using Cluster 3.0 (<http://rana.lbl.gov/EisenSoftware.htm>, accessed 1 January 2009) [3]. Only spots with recorded data on all the slides were selected for further analysis. Using these criteria, 24,024 spots were retrieved, and 10,603 of these had a corresponding gene symbol. Genes with fold changes  $\geq 95$ th percentile of genes based on the magnitude of the fold changes in expression between hyperinsulinaemic conditions and basal conditions were considered to be significantly regulated after correction for multiple testing using the Benjamini and Hochberg procedure [17]. With a

false discovery rate of 5%, the number of different genes found to be regulated during hyperinsulinaemia was 1,529 in the muscle of the controls (892 up- and 637 down-regulated) and 1,499 in the muscle of type 2 diabetic patients (1,279 up- and 220 downregulated).

**Analysis of gene promoter sequences** One thousand base pairs upstream of transcription starting site of the 30 transcription factors differentially regulated by insulin between healthy volunteers and diabetic patients were retrieved from the Cold Spring Harbor Laboratory mammalian promoter database (CSHLmpd; <http://rulai.cshl.edu/cgi-bin/CSHLmpd2/promExtract.pl?species=Human>, accessed 1 January 2009). Then, to determine which putative transcription factors could bind these promoter sequences, we used MatInspector from Genomatix (Genomatix Suite release 3.0; Genomatix, Munich, Germany) [18].

**Overexpression of BHLHB2 in primary cultures of human skeletal muscle cells** A recombinant adenovirus carrying the human *BHLHB2* (also known as *BHLHE40*) coding sequence (GenBank: AB043885.1) was constructed using a previously described procedure [19]. Differentiated myotubes were prepared from skeletal muscle biopsies from four different healthy lean volunteers, as previously described [19]. The cells were infected after 7 days of differentiation in culture medium containing 2% (vol./vol.) serum, for 48 h with recombinant adenovirus expressing either the gene encoding green fluorescent protein (GFP) (control) or the gene encoding BHLHB2.

**Creatine kinase assay** Total protein extracts from BHLHB2- and GFP-infected myotubes were used to measure creatine kinase activity by using the CK-NAC LD B kit (ref. no. 1306128) supplied by Sobioda (Montbonnot-Saint-Martin,

**Table 1** Metabolic characteristics of the volunteers

Variable	Controls (n=6)	Type 2 diabetic patients (n=6)
Sex (male/female)	3/3	3/3
Age (years)	45 $\pm$ 3	49 $\pm$ 3
BMI ( $\text{kg}/\text{m}^2$ )	23.4 $\pm$ 0.6	30.4 $\pm$ 1.0***
Fasting glucose (mmol/l)	4.9 $\pm$ 0.2	7.4 $\pm$ 0.4***
Fasting insulin (pmol/l)	40 $\pm$ 6	76 $\pm$ 12*
NEFA ( $\mu\text{mol}/\text{l}$ )	587 $\pm$ 79	484 $\pm$ 44
Triacylglycerol ( $\mu\text{mol}/\text{l}$ )	820 $\pm$ 120	1,277 $\pm$ 250
Clamp study		
Glucose (mmol/l)	4.9 $\pm$ 0.1	5.3 $\pm$ 0.2
Insulin (pmol/l)	1,038 $\pm$ 48	1,104 $\pm$ 42
Glucose disposal rate ( $\text{mmol kg}^{-1} \text{min}^{-1}$ )	0.0671 $\pm$ 0.0047	0.0308 $\pm$ 0.0054***
Glucose oxidation rate ( $\text{mmol kg}^{-1} \text{min}^{-1}$ )	0.0183 $\pm$ 0.0011	0.0098 $\pm$ 5.3*
Glucose storage ( $\text{mmol kg}^{-1} \text{min}^{-1}$ )	0.0497 $\pm$ 0.0038	0.0208 $\pm$ 0.0049*
NEFA ( $\mu\text{mol}/\text{l}$ )	38 $\pm$ 3	73 $\pm$ 15*

\* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.001$  vs controls



France) and assessing enzyme activity spectrophotometrically (wavelength 340 nm).

**Total RNA extraction from BHLHB2-infected myotubes and microarray analysis** Total RNA was extracted with Trizol reagent (Invitrogen Life Technologies, Cergy Pontoise, France). RNA samples were hybridised on RNG/MRC human set 25K microarrays (Réseau National des Génopoles, France; Medical Research Council, UK) produced by the French Genopole Network (25,342 oligonucleotides of 50-mers printed on glass slides [20]), as previously described [19]. The data set is available from the GEO database (GSE 12947).

Only spots with recorded data on the microarray from the four independent experiments were selected for analysis. Genes with fold changes  $\geq 95$ th percentile of genes based on the magnitude of fold changes between BHLHB2- and GFP-infected myotubes were considered to be significantly regulated by BHLHB2 after correction for multiple testing using the Benjamini and Hochberg procedure [17]. With a false discovery rate of 5%, we identified 2,079 different genes showing changes in expression levels after *BHLHB2* overexpression in human myotubes (1,309 up- and 770 downregulated).

**Quantitative real-time RT-PCR** Real-time RT-PCR was performed using Absolute QPCR SYBR Green ROX Mix (Abgene, Courtaboeuf, France) with a Rotor-Gene 6000 system (Corbett Life Science, Paris, France). Data are expressed as mean  $\pm$  SEM. Results were normalised with the gene encoding cyclophilin A (PPIA) used as the reference. Comparisons were analysed using Student's *t* test. Significance was defined as *p* value of  $<0.05$ .

## Results

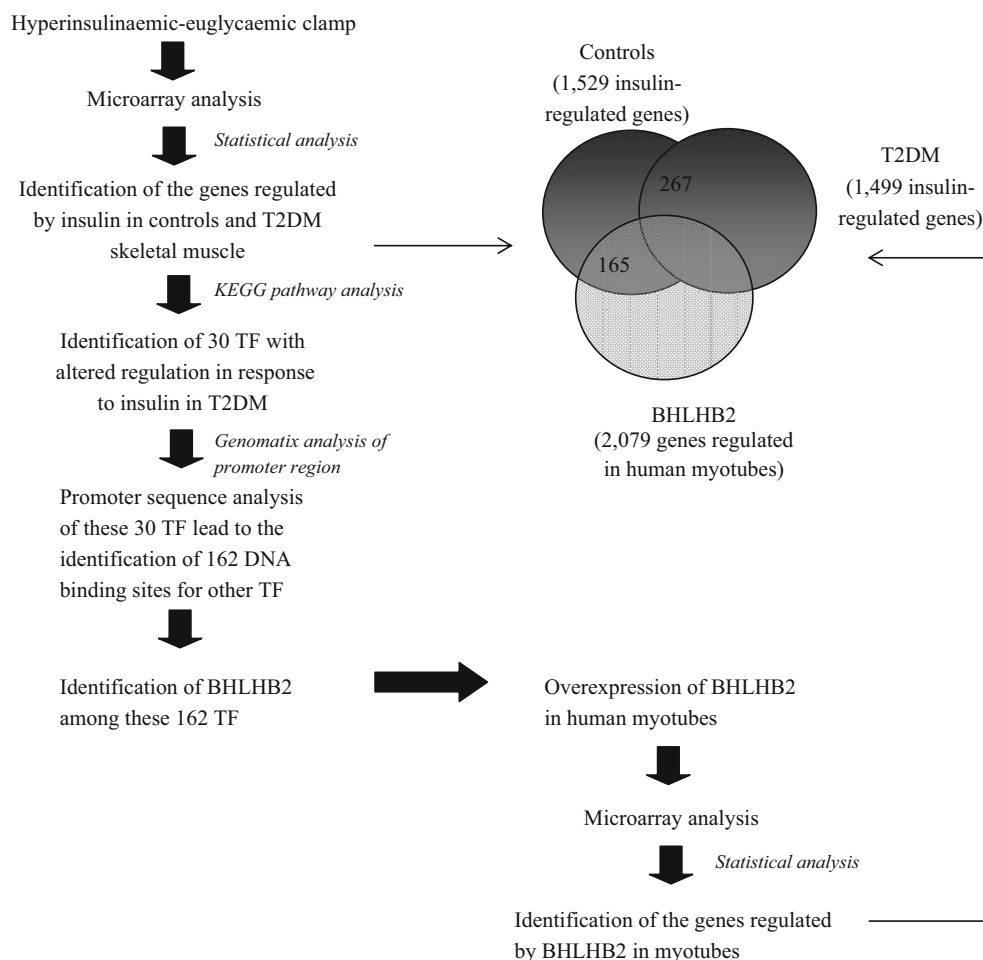
To study the action of insulin on gene expression in vivo in human skeletal muscle, healthy control volunteers and moderately obese type 2 diabetic volunteers underwent a 3 h hyperinsulinaemic–euglycaemic clamp. As shown in Table 1, the plasma insulin concentrations reached during the clamp were similar in both groups. Although not physiological, the high concentrations of insulin during the clamp ( $2 \text{ mU min}^{-1} \text{ kg}^{-1}$ ) allowed maximal glucose uptake in peripheral tissues, which was seen to be considerably lower in type 2 diabetic patients relative to the controls. This acute hyperinsulinaemia induced during a clamp is a classical method used to study the action of insulin and defective insulin signalling in type 2 diabetic patients [2–4]. Table 1 shows that both non-oxidative glucose disposal and glucose oxidation rates were significantly decreased in moderately obese type 2 diabetic

patients during the clamp. They both contributed to the reduction in the insulin-stimulated whole body glucose utilization rate in type 2 diabetic patients, indicating a state of marked insulin resistance.

**Skeletal muscle genes regulated during hyperinsulinemic clamp in healthy volunteers and type 2 diabetic patients** Microarray analysis led to the identification of 1,529 and 1,499 genes regulated by insulin in the skeletal muscle of controls and type 2 diabetic patients, respectively (Fig. 1). Among them, we noticed that the two groups had only 267 insulin-regulated genes in common, indicating a marked difference in the effect of insulin on muscle gene expression in insulin-sensitive and insulin-resistant individuals. Functional enrichment analyses using FatiGO<sup>+</sup> (<http://babelomics.bioinfo.cipf.es>, accessed 1 January 2009) and KEGG (<http://www.genome.jp/>, accessed 1 January 2009) of the set of 1,499 genes regulated in the insulin-resistant group and the set of 1,529 genes regulated in the control group did not reveal specific functions with altered regulation in the skeletal muscle of the diabetic patients. These results indicated that insulin resistance is associated with profound modifications in the response of the skeletal muscle transcriptome to insulin. To further characterise the actions of insulin on transcription, we then decided to focus on the set of genes encoding transcription factors.

**Transcription factors with impaired insulin regulation in type 2 diabetic patients** Among the 10,603 genes present on microarrays (see the Methods section), 472 were noted as being for transcription factors in the KEGG database. From this list, we found that 82 transcription factor genes displayed significant changes in their level of expression during the hyperinsulinaemic–euglycaemic clamp in the controls (65 up- and 17 downregulated). Among these 82 transcription factors, a cluster of 30 was not regulated in the diabetic patients (Table 2). Because these 30 transcription factor genes showed a coordinated altered response to insulin, we postulated that they could be under the control of common regulatory processes. To identify potential master regulators of their expression, we retrieved the promoter regions of these 30 transcription factor genes and searched for relevant DNA binding motifs for transcription factors in these *cis*-regulatory sequences. We identified 162 transcription factor-binding sites (also called ‘matrix’ in Genomatix) (Electronic supplementary material [ESM] Table 1). Interestingly, four binding sites (V\$NFKB, V\$ZNF202, V\$AHRARNT.02 and V\$DEC1.01) corresponded to transcription factor genes present in the list of the 30 with an altered response to hyperinsulinaemia (*HIVEP1*, *ZNF202*, *ARNT* and *BHLHB2*, respectively) (Table 2). This observation suggested that altered regulation of one or several of these four transcription factors might

**Fig. 1** Summary of the design and sequence of events of the study. T2DM, type 2 diabetes mellitus; TF, transcription factor



lead to the altered regulation of the whole cluster in diabetic patients.

*HIVEP1* is known to be involved in immune response [21] but its contribution to insulin action has not been described in the literature. *ZNF202* is a transcriptional repressor that is described as a regulator of the expression of genes encoding ATP-binding cassette (ABC) transporter proteins involved in lipid metabolism [22]. However, its direct involvement in mediating the actions of insulin has not yet been reported. In contrast, *ARNT* is a transcriptional activator that is already suspected to contribute to the actions of insulin on transcription in different cell types [23]. However, its relaxed binding site sequence specificity [24] has until now limited the identification of its target genes. *BHLHB2* is a transcriptional repressor. Previous studies have found that *BHLHB2* expression is increased by various extracellular stimuli [15], and it was recently reported that insulin could induce *BHLHB2* expression in human skeletal muscle [2]. We have also shown that *SREBP-1c* controls *BHLHB2* expression in human muscle cells in culture [19]. Based on these observations and the findings that *BHLHB2* possesses a DNA binding site in clearly identified promoter regions (V\$DEC1.01 matrix in

Genomatrix database) and that this gene displayed the highest fold change in response to hyperinsulinemia in controls (Table 2), we decided to study its involvement in skeletal muscle insulin action in more detail.

**The target genes and function of the transcription factor *BHLHB2* in human muscle cells** We confirmed the insulin-induced upregulation of *BHLHB2* expression in the muscle of controls by quantitative real-time RT-PCR (1.90-fold increase,  $p < 0.05$ ). In agreement with the microarray results, diabetic patients showed impaired regulation of *BHLHB2* expression in response to insulin (1.20-fold increase,  $p > 0.05$ ) (Fig. 2). We used an adenovirus expressing human *BHLHB2* combined with oligonucleotide microarrays to determine the target genes of the protein in primary cultures of human muscle cells. We verified the production of *BHLHB2* by western blot and estimated that it corresponded to an increase of about fourfold compared with levels under basal conditions (data not shown). Microarray analysis led to the identification of 2,079 mRNAs that showed a significant change in levels following *BHLHB2* overexpression (1,309 up- and 770 downregulated) (Fig. 1). Functional analysis of these genes revealed that the 1,309

**Table 2** Transcription factor genes with altered regulation by insulin in skeletal muscle of insulin-resistant type 2 diabetic patients (T2DM)

LLID	Symbol	Name	Fold change±SEM		<i>p</i> value <sup>a</sup>	GO summary function	DNA binding motif specificity (Genomatix)
			Controls	T2DM patients			
405	<i>ARNT</i> <sup>b</sup>	Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator	1.2±0.07	0.85±0.06	0.0019	Adaptative response to hypoxia/ <i>CLOCK</i> gene	V\$HIFB and V\$AHRR
429	<i>ASCL1</i>	Achaete-scute complex homologue 1 ( <i>Drosophila</i> )	1.2±0.04	0.95±0.06	0.0095	Notch signalling pathway/nervous system development	V\$MYOD
8553	<i>BHLHB2</i>	Basic helix-loop-helix domain containing, class B, 2	1.66±0.17	1.09±0.03	0.0196	Control of cell differentiation/adaptative response to hypoxia/ <i>CLOCK</i> gene	V\$HESF
3607	<i>FOXC2</i>	Forkhead box K2	1.26±0.11	0.91±0.27	0.0304		V\$FKHD
140628	<i>GATA5</i>	GATA binding protein 5	1.26±0.06	0.88±0.07	0.0036	Muscle development	V\$GATA
2736	<i>GLI2</i>	GLI-Kruppel family member GLI2	1.20±0.06	0.79±0.06	0.0015	Hedgehog signalling/myogenesis	V\$GFI1
8328	<i>GFI1B</i>	Growth factor independent 1B transcription repressor	1.30±0.08	0.78±0.06	0.0011	Regulator of erythroid and megakaryocyte development	V\$GFI1
3159	<i>HMGAI</i>	High mobility group AT-hook 1	1.21±0.08	0.91±0.007	0.0206	Regulation of insulin receptor activity	V\$SORY
3096	<i>HIVEP1</i>	Human immunodeficiency virus type 1 enhancer binding protein 1	1.22±0.04	0.91±0.10	0.0322	Apoptosis	V\$NFKB
4807	<i>NHLH1</i>	Nescient helix-loop-helix 1	1.19±0.06	0.72±0.08	0.0012	Regulation of body weight metabolism	V\$HAND
4775	<i>NFATC3</i>	Nuclear factor of activated T cells, cytoplasmic, calcineurin-dependent 3	1.25±0.09	0.80±0.07	0.0019	Muscle development	V\$NFAT
4782	<i>NFIC</i>	Nuclear factor I/C (CCAAT-binding transcription factor)	1.20±0.07	0.75±0.07	0.0005	Negative sensor of oxidative stress	V\$NF1F
8648	<i>NCOA1</i>	Nuclear receptor coactivator 1	1.37±0.19	0.81±0.03	0.0355	Lipid metabolism	
6939	<i>TCF15</i>	Transcription factor 15 (basic helix-loop-helix)	1.24±0.07	0.80±0.06	0.0011	Muscle development	V\$HAND
7027	<i>TFDP1</i>	Transcription factor Dp-1	1.29±0.03	0.90±0.02	0.0189	Muscle development	V\$E2FF
5966	<i>REL</i>	V-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homologue (avian)	1.4±0.07	0.98±0.11	0.0135	Cytokine production/nuclear factor κB cascade	ND
342945	<i>ZSCAN22</i>	Zinc finger and SCAN domain containing 22	1.48±0.3	0.65±0.04	0.0400		ND
6935	<i>ZEB1</i>	Zinc finger E-box binding homeobox 1	1.24±0.12	0.87±0.08	0.0411	Muscle development	V\$ZFHx
284307	<i>ZIK1</i>	Zinc finger protein interacting with K protein 1 homologue	1.20±0.04	0.81±0.17	0.0002		ND
7743	<i>ZNF189</i>	Zinc finger protein 189	1.49±0.08	1.09±0.07	0.0056		ND
7753	<i>ZNF202</i>	Zinc finger protein 202	1.20±0.07	0.78±0.16	0.008	Lipid metabolism	V\$ZBPF
10127	<i>ZNF263</i>	Zinc finger protein 263	1.34±0.08	1.00±0.06	0.0096		ND
1628	<i>DBP</i>	D site of albumin promoter (albumin D-box) binding protein	0.64±0.05	0.87±0.07	0.0313		V\$PARF
2099	<i>ESR1</i>	Oestrogen receptor 1	0.77±0.05	1.04±0.06	0.0069	Nitric-oxide synthase regulatory activity	V\$SEREF
2309	<i>FOXO3</i>	Forkhead box O3	0.75±0.02	1.03±0.06	0.0227	Muscle development/energy metabolism/insulin signalling	V\$FKHD

**Table 2** (continued)

LLID	Symbol	Name	Fold change±SEM		<i>p</i> value <sup>a</sup>	GO summary function	DNA binding motif specificity (Genomatix)
			Controls	T2DM patients			
4781	<i>NFIB</i>	Nuclear factor I/B	0.70±0.01	1.03±0.11	0.0010	Negative regulation of Notch signalling pathway/development	V\$NF1F
4792	<i>NFKBIA</i>	Nuclear factor of $\kappa$ light polypeptide gene enhancer in B cells inhibitor, $\alpha$	0.57±0.04	0.73±0.08	0.0457	Notch signalling pathway	ND
5308	<i>PITX2</i>	Paired-like homeodomain 2	0.8±0.03	1.01±0.11	0.0453	Muscle development	V\$BCDF
7068	<i>THRB</i>	Thyroid hormone receptor, beta (erythroblastic leukaemia viral (v-erb-a) oncogene homologue 2, avian)	0.76±0.02	1.04±0.11	0.0152	Steroid hormone receptor activity/regulation of heart contraction	V\$RXRF
7594	<i>ZNF43</i>	Zinc finger protein 43	0.84±0.02	0.92±0.13	0.0370		ND

<sup>a</sup>From Student's *t* test

<sup>b</sup>Also known as *HIF1B*

GO, Gene Ontology from Babelomics; LLID, Locus Link Gene ID; ND, not determined

upregulated genes were significantly enriched with genes related to transcription, translation (ribosome) or RNA synthesis, whereas the 770 downregulated genes were enriched with genes encoding proteins involved in muscle functions (contraction and development), which are mostly located in cytoskeleton and myofibrils (ESM Table 2).

Because the forced expression of *BHLHB2* could have resulted in indirect regulation, we further limited the analysis to the direct target genes of *BHLHB2* by selecting those with V\$DEC1.01 matrix in their promoter sequence (*BHLHB2* DNA binding motif in Genomatix). Among the 2,079 genes regulated in myotubes overexpressing *BHLHB2*, 1,647 had a promoter sequence available in promoter databases. Using Genomatix, we found that only 1.6% of the upregulated genes displayed at least one V\$DEC1.01 motif in their promoter sequence while about 22% (125 genes) of the downregulated genes could be considered as direct target genes of *BHLHB2*. This result was in agreement with the known transcriptional repressor function of *BHLHB2* [15, 25]. This also indicated that the majority of the upregulated genes were probably upregulated as a result of indirect effects of forced *BHLHB2* production. The 125 downregulated genes with a V\$DEC1.01 motif in their promoter region encoded cytoskeleton structural proteins and proteins involved in regulating transcription and translation (ESM Table 3).

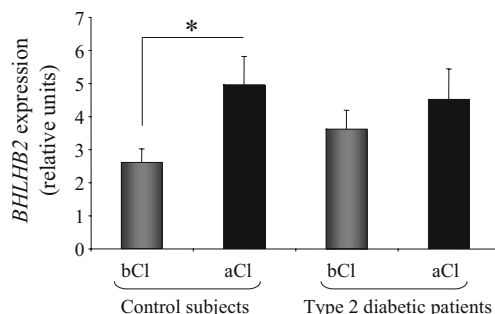
To determine whether *BHLHB2* could be involved in the control of muscle functions, we measured creatine kinase activity in differentiated human myotubes expressing either the gene encoding *BHLHB2* or the gene encoding GFP (control).

As shown in Fig. 3, creatine kinase activity was reduced in the presence of *BHLHB2*. This result is in agreement with an expected decreased of muscle cell energy status upon *BHLHB2* expression, as suggested by microarray results indicating the downregulation of several muscle-specific genes.

*Implication of BHLHB2 in the effects of insulin on transcription in skeletal muscle* Among the 2,079 genes affected by the overexpression of *BHLHB2* in muscle cells, 165 genes were also included in the set of 1,529 genes regulated in the skeletal muscle of the controls, thus representing more than 10% of the genes regulated during hyperinsulinaemia. This result suggested that a significant proportion of the actions of insulin on transcription in human muscle could involve the transcription factor *BHLHB2*. Investigation of the genes regulated in the muscle of diabetic patients revealed a subset of 31 genes that also appeared in the list of *BHLHB2*-regulated genes (Table 3). Two of these contained V\$DEC1.01 motifs and could be considered to be direct targets of *BHLHB2*. These encoded *HIVEP1*, which is present in the list of transcription factors with altered regulation in response to insulin in type 2 diabetic patients (Table 2), and *SLC5A3*, an osmoprotective protein [26].

## Discussion

In agreement with previous reports [2–4], the results from our microarray data analysis confirmed major effects of insulin on gene expression in human skeletal muscle in



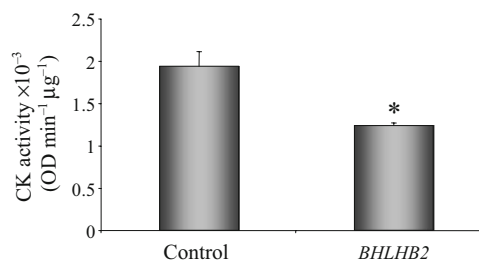
**Fig. 2** Fold change of *BHLHB2* expression in the skeletal muscle of insulin-sensitive volunteers or insulin-resistant type 2 diabetic patients before (bCl) or after (aCl) a 3 h hypersulinaemic–euglycaemic clamp. Fold changes are expressed as relative units. \* $p < 0.05$  using the paired Student's *t* test

vivo. The affected genes encoded proteins involved in almost all cellular functions, in agreement with the wide spectrum of actions of insulin [3]. We also observed that insulin resistance in moderately obese type 2 diabetic patients was associated with a profound disorganisation of the pattern of genes normally regulated during hyperinsulinaemia. Over the last decade, several studies have identified altered insulin regulation in the muscle of type 2 diabetic patients. However, only a limited number of candidate genes have been studied [10–12, 27, 28]. Using large-scale analysis we found that more than 80% of the regulated genes in the muscle of healthy individuals displayed an impaired insulin response in the muscle of type 2 diabetic patients. This global modification indicates that the altered regulation of gene expression by insulin is certainly not a consequence of a specific defect at the level of a given transcription factor, but, rather, the result of upstream alterations in insulin action. This conclusion is consistent with the currently accepted cause of insulin resistance in type 2 diabetes involving defective phosphorylation of IRS-1 [29–31]. Such an alteration of the first step of the insulin signalling cascade probably modifies the regulation of several transcription factors and drastically changes the pattern of gene expression during hyperinsulinaemia. However, it should be mentioned that the effect of obesity-related insulin resistance, in addition to diabetes, could have also contributed to the findings. Of note, the regulation of 267 genes was not affected, and these genes displayed a similar response in the muscle of insulin-sensitive and insulin-resistant individuals. These genes could be regulated by a pathway independent from the altered insulin signalling pathway, or, more likely, could be controlled by variables other than hyperinsulinaemia during the clamp.

When focusing on the transcription factors that were regulated during hyperinsulinaemia in the control group but not in the insulin-resistant patients, we identified a subset of 30 genes with an impaired response. Interestingly, two of

them (*ESR1* and *NFKB1A*) have previously been associated with type 2 diabetes and insulin resistance traits in genetic studies [32, 33], and individuals with defective *HMGAI* expression showed decreased insulin receptor levels and a diabetic phenotype [34]. Thus, the altered regulation of the expression of these genes by insulin may contribute to the pathology. With the aim of furthering our understanding of the molecular causes of the deregulation of the expression of these 30 genes, we analysed the presence of potential binding sites for regulatory factors in their promoter regions. Among the potential candidates, we decided to focus on *BHLHB2*, a transcriptional repressor that plays pivotal roles in multiple signalling pathways that affect many biological processes, including development, cell differentiation, cell growth, cell death, oncogenesis, immune systems and circadian rhythm [15]. In view of the multiple biological actions of insulin, these observations strongly suggested *BHLHB2* as one of the possible mediators of the effects of insulin. In line with this, a recent report showed that *BHLHB2* inhibits the expression of insulin-induced lipogenic genes by inhibiting the binding of carbohydrate response element-binding protein to the carbohydrate response element of the *FASN* gene promoter [35]. Moreover, its expression is strongly increased in the liver of *ob/ob* mice and in mice fed a high-fat diet [35]. Furthermore, *BHLHB2* shows the highest fold change in expression in response to insulin in the muscle of controls (Table 2), and its induction during the clamp was clearly validated using quantitative real-time RT-PCR. Finally, its DNA binding site is well-described in the databases, allowing prediction of its potential targets in the lists of genes obtained by microarray in the muscle of the two groups of volunteers.

To determine the contribution of *BHLHB2* to the effects of insulin on transcription, we overexpressed the gene for this transcription factor in differentiated human myotubes using an adenoviral vector. Microarray analysis of the transcriptional changes induced by *BHLHB2* revealed that about 10% of the genes regulated in vivo during hyperinsulinaemia in the skeletal muscle of healthy individuals



**Fig. 3** Creatine kinase activity in human myotubes overexpressing *BHLHB2* or the gene encoding GFP (control). \* $p < 0.05$  using the paired Student's *t* test



**Table 3** Target genes of BHLHB2 in human myotubes with impaired regulation in response to insulin in skeletal muscle of type 2 diabetic patients (T2DM)

GP summary function <sup>a</sup>	Gene ID <sup>b</sup>	Gene symbol	Name	Fold change in myotubes infected with <i>BHLHB2</i>		Hyperinsulinaemic–euglycaemic clamp		<i>p</i> value <sup>c</sup>
				Mean ± SEM	Mean ± SEM	Fold change in T2DM patients	Fold change in controls	
Helicase activity	80205	<i>CHD9</i>	Chromodomain helicase DNA binding protein 9	1.31±0.09	0.99±0.05	1.34±0.05	0.001	
Protein tyrosine kinase activity/ Ras protein signal transduction/ blood vessel development	1399	<i>CRKL</i>	V-erk sarcoma virus CT10 oncogene homologue (avian)-like	1.3±0.20	0.83±0.06	1.22±0.08	0.005	
Chitin catabolic process	1486	<i>CTBS</i>	Chitinase, di- <i>N</i> -acetyl-	1.79±0.14	0.72±0.07	1.20±0.08	0.001	
Heat shock protein	3338	<i>DNAJC4</i>	DnaJ (Hsp40) homologue, subfamily C, member 4	1.47±0.16	0.84±0.09	1.26±0.06	0.004	
Translation initiation factor	10209	<i>EIF1</i>	Eukaryotic translation initiation factor 1	1.41±0.26	1.08±0.05	1.43±0.07	0.003	
Fibroblast growth factor/Ras protein signal transduction/ regulation of blood vessel endothelial cell	2247	<i>FGF2</i>	Fibroblast growth factor 2 (basic)	2.6±0.71	0.87±0.06	1.20±0.05	0.003	
–	26127	<i>FGFR1OP2</i>	FGFR1 oncogene partner 2	1.39±0.13	0.83±0.1	1.24±0.05	0.009	
G protein-coupled receptor /Wnt receptor signalling pathway	8325	<i>FZD8</i>	Frizzled homologue 8 ( <i>Drosophila</i> )	1.43±0.12	0.87±0.08	1.23±0.07	0.010	
Transcription	3096	<i>HIVEP1</i>	Human immunodeficiency virus type 1 enhancer binding protein 1	1.43±0.16	0.92±0.1	1.22±0.04	0.032	
G protein-coupled receptors/[blood circulation/circadian rhythm	3363	<i>HTR7</i>	5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 7	1.33±0.20	0.72±0.06	1.26±0.08	0.0006	
–	9895	<i>KIAA0329</i>	KIAA0329	1.55±0.15	0.88±0.12	1.41±0.15	0.025	
–	441108	<i>LOC441108</i>	Hypothetical gene supported by AK128882	1.41±0.28	0.92±0.07	1.20±0.06	0.022	
Antigen processing and presentation	3140	<i>MRI</i>	Major histocompatibility complex, class I-related	1.88±0.19	0.87±0.04	1.20±0.04	0.0002	
N-myc downregulated gene/apoptosis	10397	<i>NDRG1</i>	N-myc downstream regulated gene 1	1.38±0.06	0.89±0.09	1.25±0.08	0.019	
Oxidoreductase activity/ NADPH dehydrogenase	4835	<i>NQO2</i>	NAD(P)H dehydrogenase, quinone 2	0.72±0.05	1.36±0.09	0.78±0.02	0.001	
mRNA export from nucleus	57122	<i>NUP107</i>	Nucleoporin 107 kDa	1.6±0.04	0.91±0.09	1.28±0.06	0.008	
mRNA export from nucleus	55746	<i>NUP133</i>	Nucleoporin 133 kDa	1.32±0.02	0.69±0.06	1.25±0.07	0.0002	
–	79627	<i>OGFRL1</i>	Opioid growth factor receptor-like 1	1.3±0.06	0.76±0.05	1.29±0.22	0.040	
Phosphoinositide phospholipase C activity/intracellular signalling cascade	5336	<i>PLCG2</i>	Phospholipase C, gamma 2 (phosphatidylinositol-specific)	1.57±0.29	2.1±0.36	1.20±0.06	0.040	
Oxidoreductase activity	5447	<i>POR</i>	P450 (cytochrome) oxidoreductase	0.64±0.11	1.22±0.13	0.81±0.03	0.026	
Serine-type peptidase activity	5649	<i>RELN</i>	Reelin	1.52±0.04	0.95±0.06	1.20±0.06	0.021	
–	25950	<i>RWDD3</i>	RWD domain containing 3	1.6±0.20	0.94±0.09	1.21±0.05	0.032	
Protein kinase activity/cytoskeleton	57147	<i>SCYL3</i>	SCY1-like 3 ( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> )	1.38±0.09	0.97±0.04	1.20±0.06	0.017	

**Table 3** (continued)

GP summary function <sup>a</sup>	Gene ID <sup>b</sup>	Gene symbol	Name	Hyperinsulinaemic–euglycaemic clamp		<i>p</i> value <sup>c</sup>
				Fold change in T2DM patients Mean ± SEM	Fold change in controls Mean ± SEM	
Osmoprotectant	91404	<i>SESTD1</i>	SEC14 and spectrin domains 1	0.81±0.12	1.20±0.07	0.026
	6526	<i>SLC3A3</i>	Solute carrier family 5 (sodium/myo-inositol cotransporter)	1.98±0.47	0.78±0.06	0.049
Transport of mRNA via the microtubule network	6780	<i>STAU1</i>	Staufen, RNA binding protein, homologue 1 ( <i>Drosophila</i> )	0.83±0.09	1.28±0.12	0.017
–	83604	<i>TMEM47</i>	Transmembrane protein 47	0.71±0.03	1.21±0.10	0.002
–	6737	<i>TRIM21</i>	Tripartite motif-containing 21	0.81±0.08	1.20±0.05	0.006
Regulation of transcription	8848	<i>TSC22D1</i>	TSC22 domain family, member 1	2.02±0.21	1.37±0.05	0.027
Regulation of transcription	57659	<i>ZBTB4</i>	Zinc finger and BTB domain containing 4	0.89±0.06	1.28±0.07	0.003
Regulation of transcription	64288	<i>ZNF323</i>	Zinc finger protein 323	0.74±0.06	1.26±0.07	0.0002

<sup>a</sup> – indicates that the function is not known

<sup>b</sup> From the US National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/>, accessed 1 January 2009)

<sup>c</sup> *p*<0.05 for T2DM fold changes vs control fold changes by Student's *t* test

GO, Gene Ontology from Babelomics

**Table 4** Transcription factor binding sites found in the genes downregulated by the overexpression of *BHLHB2* in human myotubes

Transcription factor binding site (Genomatix annotation)	Genes downregulated by <i>BHLHB2</i>		Name of the binding site (Genomatix annotations)	Transcription factors associated with the transcription factor binding sites	
	Genes with a <i>BHLHB2</i> binding site (%)	Genes without a V\$DEC1 motif (%)			Z score
V\$CREB	97.6	86.3	3.6	cAMP-responsive element binding proteins	ATF1, ATF2, ATF3, ATF4, ATF5, ATF6, ATF7, CREB1, CREB3, CREB3L3, CREB3L4, CREB5, CREBL1, CREM, JUN, NFIL3, XBP1
V\$EBOX	93.7	77.8	4.1	E-box binding factors	ATF6, CREBL1, MAX, MGA, MLX, MLXIP, MNT, MXI1, MYC, MYCL1, MYCL2, MYCN, TCF4, USF1, USF2
V\$HIF	80.5	43.8	7.3	Hypoxia inducible factor, bHLH/PAS protein family	ARNT, ARNT2, ARNTL, ARNTL2, CLOCK, EPAS1, HIF1A, HIF3A, NPAS1, NPAS2
V\$AHR	81.2	69.7	2.6	AHR-arnet heterodimers and AHR-related factors	AHR, ARNT, NPAS4, SIM1, SIM2
V\$PARF	78.1	67.7	2.3	PAR/bZIP family	DBP, HLF, TEF, VBP1
V\$CDXF	67.2	54.9	2.5	Vertebrate caudal related homeodomain protein	CDX1, CDX2, CDX4
V\$SREB	61.7	44.6	3.4	Sterol regulatory element binding proteins	SREBP-1a, SREBP-1c, SREBP-2, SREBF2
V\$MEF2	61.7	50.1	2.3	MEF2, myocyte-specific enhancer binding factor	MEF2A, MEF2AP, MEF2B, MEF2C, MEF2D, MYEF2
V\$OVOL	56.2	43.8	2.5	OVO homolog-like transcription factors	OVOL1
V\$CHRE	50	31.6	3.8	Carbohydrate response elements	MLX, MLXIP
V\$GZF1	38.3	28.5	2.1	GDNF-inducible zinc finger gene 1	ZNF336
V\$CHOP	31.2	17.8	3.3	C/EBP homologous protein (CHOP)	DDIT3
V\$MITF	31.2	22.4	2.0	Microphthalmia transcription factor	MITF, TFE3, TFEB, TFEC

The promoter sequences (1,000 bp upstream of the transcription starting site) of the genes downregulated by the overexpression of *BHLHB2* in human myotubes were retrieved and scanned for transcription factor binding sites by using MatInspector from Genomatix. We identified 125 genes with a DNA binding motif for *BHLHB2* (named V\$DEC1 in the Genomatix database). We then compared the promoter environment of the 125 *BHLHB2* putative direct target genes with the promoter environment of the genes downregulated by *BHLHB2* that did not contain a V\$DEC1 motif (non-target). For each transcription factor binding site, we calculated its percentage in the promoter region of *BHLHB2* direct target genes (i.e. the number of times the DNA binding motif of the transcription factor was found in the promoter region) and its percentage in the promoter region of the *BHLHB2* non-target genes. Z scores were calculated to compare these percentages. A significant difference corresponded to a Z score of >1.96, and this indicated that the transcription factor binding site showed significant frequencies in the set of genes with the V\$DEC1 motif vs the set of genes without the V\$DEC1 motif.



are also regulated by *BHLHB2* overexpression in human muscle cells, suggesting a possible contribution of this transcription factor in insulin action. As in our study, a recent report showed that *BHLHB2* expression is induced by insulin in human muscle [2]. Although this remains to be demonstrated in muscle, this effect of insulin on *BHLHB2* expression is likely to be mediated through the activation of the PI3-kinase pathway, as evidenced in rat liver [36]. Under such conditions, the impaired regulation of *BHLHB2* expression in type 2 diabetic patients might certainly be a consequence of the well-demonstrated defective activation of this signalling pathway in response to hyperinsulinaemia in the skeletal muscle of these patients [29, 30, 37].

Promoter analysis of the 125 genes with binding sites for BHLHB2 revealed that there was a significant association between the presence of binding sites for BHLHB2 and the presence of DNA binding sites for several other transcription factors (Table 4). Interestingly, recent observations showed possible interactions between BHLHB2 and the carbohydrate response element (CHRE motif) in the promoter regions of key genes involved in lipogenesis in the liver [35], suggesting an unexpected role of BHLHB2 in the regulation of metabolism [35]. In agreement with this, we found that half of the 125 BHLHB2 target genes also contained CHRE motifs (V\$CHRE in Table 4), including the gene coding l-pyruvate kinase (ESM Table 3). In addition, more than 60% of genes directly targeted by BHLHB2 also had putative sterol regulatory element (SRE) motifs for transcription factors related to the SREBP family (V\$SREB in Table 4). SREBP proteins are transcriptional activators involved in lipid metabolism and are strongly activated by insulin in vitro and in vivo [7, 11]. The interplay between SREBP-1 and BHLHB2 is also supported by recent data showing a remarkable increase in *BHLHB2* mRNA levels in human myotubes [19, 35] and in mouse hepatocytes [35] following *SREBP-1* (also known as *SREBF1*) overexpression. Furthermore, under hypoxic conditions, BHLHB2 appeared to repress the expression of *SREBF1*, a major mediator of insulin action [7], hence contributing to the repression of lipogenesis and ATP generation to protect cells from the risk of energy failure [38]. The recent literature suggests a possible role for BHLHB2 in the control of lipid metabolism and lipogenesis in the liver of rodents [35]. Taken together, these data suggest that BHLHB2 could be a novel mediator of the regulatory effects of insulin on glucose and lipid metabolism. Further studies are now needed to verify this hypothesis, especially in human tissues. In humans, Coletta et al. recently reported an increased *BHLHB2* mRNA levels in the muscle of non-obese type 2 diabetic patients [2]. We also noted a tendency for an increased expression in the

muscle of the obese type 2 diabetic patients included in this study, but the difference did not reach significance (Fig. 2).

Finally, we found that genes that had their expression downregulated by BHLHB2 showed significant enrichment of myocyte-specific enhancer binding factor binding sites, which bind major transcription factors involved in muscle development [39] (V\$MEF2 motifs in Table 4). This is consistent with the downregulation of several muscle-specific markers in myotubes overexpressing *BHLHB2*. In agreement with this observation, we found that increased levels of BHLHB2 in human myotubes promoted a significant decrease in creatine kinase activity. This also suggests that the impaired regulation of *BHLHB2* expression observed in insulin-resistant patients may be associated with altered levels of creatine kinase activity in muscle, a situation that characterises low energy status and mitochondrial dysfunction, as classically observed in type 2 diabetes [40]. Furthermore, recent observations indicate that, in addition to decreased levels of mitochondria, type 2 diabetes is also associated with structural changes in skeletal muscle, including signs of muscle atrophy and decreased muscle fibre transformation [41]. Taken together, these data support the hypothesis that impaired regulation of BHLHB2 contributes to these structural defects in the skeletal muscle of the diabetic patients.

Insulin action on transcription in skeletal muscle induces a complex pattern of gene expression that is poorly described. Our strategy, based on the comparison of two physiological situations (insulin-sensitivity vs insulin-resistance) using microarrays permitted the identification major alterations in gene expression during hyperinsulinaemia in the muscle of moderately obese type 2 diabetic patients and the identification of 30 transcription factors with impaired insulin regulation. Among them, BHLHB2 is a potential novel mediator of the effects of insulin on transcription, and we found that 10% of the genes regulated by insulin in controls are potentially under its control. We further documented its deregulation in response to hyperinsulinaemia in the skeletal muscle of type 2 diabetic patients. Taken together, these data clearly show that BHLHB2 is an interesting and relevant mediator of insulin actions and of defective insulin signalling in type 2 diabetes.

**Acknowledgements** The authors thank E. Loizon and N. Vega for RNA extractions; C. Picat and C. Debard for human muscle cell culture; J. Vouillarmet for skeletal muscle biopsies; and J. Delarichaudy for creatine kinase activity quantification (all at INRA 1235, INSERM 870, INSA-Lyon, Régulations Métaboliques Nutrition et Diabète, Université de Lyon, Oullins, France). This work was supported by research grants from INSERM (ATC-nutrition n°4NU10G), INRA, Inter-EPST Bioinformatic Program, EZUS-Lyon1, Région Rhône-Alpes, Institut de Recherche Servier, ALFEDIAM-Roche and La Fondation Claude Bernard.

**Duality of interest** The authors declare that there is no duality of interest associated with this manuscript.

## References

- Virkamaki A, Ueki K, Kahn CR (1999) Protein–protein interaction in insulin signaling and the molecular mechanisms of insulin resistance. *J Clin Invest* 103:931–943
- Coletta DK, Balas B, Chavez AO et al (2008) Effect of acute physiological hyperinsulinemia on gene expression in human skeletal muscle in vivo. *Am J Physiol* 294:E910–E917
- Rome S, Clement K, Rabasa-Lhoret R et al (2003) Microarray profiling of human skeletal muscle reveals that insulin regulates approximately 800 genes during a hyperinsulinemic clamp. *J Biol Chem* 278:18063–18068
- Wu X, Wang J, Cui X et al (2007) The effect of insulin on expression of genes and biochemical pathways in human skeletal muscle. *Endocrine* 31:5–17
- Jee S, Hwang D, Seo S et al (2007) Microarray analysis of insulin-regulated gene expression in the liver: the use of transgenic mice co-expressing insulin-siRNA and human IDE as an animal model. *Int J Mol Med* 20:829–835
- O'Brien RM, Granner DK (1996) Regulation of gene expression by insulin. *Physiol Rev* 76:1109–1161
- Osborne TF (2000) Sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs): key regulators of nutritional homeostasis and insulin action. *J Biol Chem* 275:32379–32382
- Chahal J, Chen CC, Rane MJ et al (2008) Regulation of insulin-response element binding protein-1 in obesity and diabetes: potential role in impaired insulin-induced gene transcription. *Endocrinology* 149:4829–4836
- Barthel A, Schmoll D, Unterman TG (2005) FoxO proteins in insulin action and metabolism. *Trends Endocrinol Metab* 16:183–189
- Andersen PH, Lund S, Vestergaard H, Junker S, Kahn BB, Pedersen O (1993) Expression of the major insulin regulatable glucose transporter (GLUT4) in skeletal muscle of noninsulin-dependent diabetic patients and healthy subjects before and after insulin infusion. *J Clin Endocrinol Metab* 77:27–32
- Ducluzeau PH, Perretti N, Laville M et al (2001) Regulation by insulin of gene expression in human skeletal muscle and adipose tissue. Evidence for specific defects in type 2 diabetes. *Diabetes* 50:1134–1142
- Vestergaard H, Bjorbaek C, Hansen T, Larsen FS, Granner DK, Pedersen O (1995) Impaired activity and gene expression of hexokinase II in muscle from non-insulin-dependent diabetes mellitus patients. *J Clin Invest* 96:2639–2645
- Patti ME, Butte AJ, Crunkhorn S et al (2003) Coordinated reduction of genes of oxidative metabolism in humans with insulin resistance and diabetes: potential role of *PGC1* and *NRF1*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:8466–8471
- Mootha VK, Lindgren CM, Eriksson KF et al (2003) PGC-1 $\alpha$ -responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes. *Nat Genet* 34:267–273
- Yamada K, Miyamoto K (2005) Basic helix-loop-helix transcription factors, BHLHB2 and BHLHB3; their gene expressions are regulated by multiple extracellular stimuli. *Front Biosci* 10:3151–3171
- Laville M, Auboeuf D, Khalifallah Y, Vega N, Riou JP, Vidal H (1996) Acute regulation by insulin of phosphatidylinositol-3-kinase, Rad, Glut 4, and lipoprotein lipase mRNA levels in human muscle. *J Clin Invest* 98:43–49
- Benjamini Y, Hochberg Y (1995) Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J R Stat Soc: Ser B (Methodol)* 57:289–300
- Cartharius K, Frech K, Grote K et al (2005) MatInspector and beyond: promoter analysis based on transcription factor binding sites. *Bioinformatics (Oxford, England)* 21:2933–2942
- Rome S, Lecomte V, Meugnier E et al (2008) Microarrays analysis of SREBP-1a and SREBP-1c target genes identify new regulatory pathways in muscle. *Physiol Genomics* 34:327–337
- Le Brigand K, Russell R, Moreilhon C et al (2006) An open-access long oligonucleotide microarray resource for analysis of the human and mouse transcriptomes. *Nucleic Acids Res* 34:e87
- Nomura N, Zhao MJ, Nagase T et al (1991) HIV-EP2, a new member of the gene family encoding the human immunodeficiency virus type 1 enhancer-binding protein. Comparison with HIV-EP1/PRDII-BF1/MBP-1. *J Biol Chem* 266:8590–8594
- Schmitz G, Langmann T (2005) Transcriptional regulatory networks in lipid metabolism control ABCA1 expression. *Biochim Biophys Acta* 1735:1–19
- Zelzer E, Levy Y, Kahana C, Shilo BZ, Rubinstein M, Cohen B (1998) Insulin induces transcription of target genes through the hypoxia-inducible factor HIF-1 $\alpha$ /ARNT. *EMBO J* 17:5085–5094
- Swanson HI, Chan WK, Bradfield CA (1995) DNA binding specificities and pairing rules of the Ah receptor, ARNT, and SIM proteins. *J Biol Chem* 270:26292–26302
- St-Pierre B, Flock G, Zacksenhaus E, Egan SE (2002) Stra13 homodimers repress transcription through class B E-box elements. *J Biol Chem* 277:46544–46551
- Klaus F, Palmada M, Lindner R et al (2008) Up-regulation of hypertonicity-activated myo-inositol transporter SMI1 by the cell volume-sensitive protein kinase SGK1. *J Physiol* 586:1539–1547
- Pendergrass M, Koval J, Vogt C et al (1998) Insulin-induced hexokinase II expression is reduced in obesity and NIDDM. *Diabetes* 47:387–394
- Andreelli F, Laville M, Ducluzeau PH et al (1999) Defective regulation of phosphatidylinositol-3-kinase gene expression in skeletal muscle and adipose tissue of non-insulin-dependent diabetes mellitus patients. *Diabetologia* 42:358–364
- Frojo S, Vidal H, Pirola L (2009) Alterations of insulin signaling in type 2 diabetes: a review of the current evidence from humans. *Biochim Biophys Acta* 1792:83–92
- Bouzakri K, Roques M, Gual P et al (2003) Reduced activation of phosphatidylinositol-3 kinase and increased serine 636 phosphorylation of insulin receptor substrate-1 in primary culture of skeletal muscle cells from patients with type 2 diabetes. *Diabetes* 52:1319–1325
- Draznin B (2006) Molecular mechanisms of insulin resistance: serine phosphorylation of insulin receptor substrate-1 and increased expression of p85 $\alpha$ : the two sides of a coin. *Diabetes* 55:2392–2397
- Dahlman I, Vaxillaire M, Nilsson M et al (2008) Estrogen receptor alpha gene variants associate with type 2 diabetes and fasting plasma glucose. *Pharmacogenet Genomics* 18:967–975
- Romzova M, Hohenadel D, Kolostova K et al (2006) NF $\kappa$ B and its inhibitor I $\kappa$ B in relation to type 2 diabetes and its microvascular and atherosclerotic complications. *Hum Immunol* 67:706–713
- Foti D, Chieffari E, Fedele M et al (2005) Lack of the architectural factor HMGA1 causes insulin resistance and diabetes in humans and mice. *Nat Med* 11:765–773
- Iizuka K, Horikawa Y (2008) Regulation of lipogenesis via BHLHB2/DEC1 and ChREBP feedback looping. *Biochem Biophys Res Commun* 374:95–100

36. Yamada K, Kawata H, Shou Z, Mizutani T, Noguchi T, Miyamoto K (2003) Insulin induces the expression of the *SHARP-2/Stra13/DEC1* gene via a phosphoinositide 3-kinase pathway. *J Biol Chem* 278:30719–30724
37. Krook A, Roth RA, Jiang XJ, Zierath JR, Wallberg-Henriksson H (1998) Insulin-stimulated Akt kinase activity is reduced in skeletal muscle from NIDDM subjects. *Diabetes* 47:1281–1286
38. Choi SM, Cho HJ, Cho H, Kim KH, Kim JB, Park H (2008) Stra13/DEC1 and DEC2 inhibit sterol regulatory element binding protein-1c in a hypoxia-inducible factor-dependent mechanism. *Nucleic Acids Res* 36:6372–6385
39. Naya FJ, Olson E (1999) MEF2: a transcriptional target for signaling pathways controlling skeletal muscle growth and differentiation. *Curr Opin Cell Biol* 11:683–688
40. Kelley DE, He J, Menshikova EV, Ritov VB (2002) Dysfunction of mitochondria in human skeletal muscle in type 2 diabetes. *Diabetes* 51:2944–2950
41. Sun Z, Liu L, Liu N, Liu Y (2008) Muscular response and adaptation to diabetes mellitus. *Front Biosci* 13:4765–4794

## Discussion

En utilisant une approche bioinformatique, nous avons mis en évidence le rôle du répresseur transcriptionnel BHLHB2, cible des facteurs de transcription SREBP-1, dans la régulation de nombreux gènes cibles de l'insuline, et montré ainsi son implication dans l'action transcriptionnelle de l'insuline et dans l'altération de la réponse à l'insuline au cours du DT2.

En accord avec de précédentes études, les résultats de l'analyse transcriptomique que nous avons réalisée ici confirment les effets majeurs de l'insuline sur l'expression génique dans le muscle squelettique humain (Rome *et al.* 2003; Wu *et al.* 2007; Coletta *et al.* 2008). Les gènes affectés par l'insuline codent pour des protéines impliquées dans toutes les fonctions cellulaires ou presque, confirmant le large spectre d'action de l'insuline. Chez les patients diabétiques de type 2 modérément obèses, nous observons que l'insulino-résistance est associée à une profonde modification des gènes normalement régulés au cours de l'hyperinsulinémie. Plusieurs études ont déjà démontré l'altération de la régulation génique par l'insuline chez les patients DT2. Mais seulement un nombre limité de gènes candidats a été étudié (Andersen *et al.* 1993; Vestergaard *et al.* 1995; Ducluzeau *et al.* 2001). Grâce à une analyse à large échelle, nous montrons que plus de 80% des gènes régulés par l'insuline chez les sujets sains présentent une altération de leur réponse à l'insuline dans le muscle des patients DT2. Cette modification globale indique que l'altération de la réponse à l'insuline chez le patient DT2 ne résulte pas d'un défaut spécifique de régulation d'un facteur de transcription en particulier mais plutôt d'un défaut de transduction du signal de l'insuline, à l'origine de l'ensemble des effets transcriptionnels. Ces résultats sont en cohérence avec une des causes reconnues de l'insulino-résistance musculaire, à savoir, le défaut de phosphorylation du substrat du récepteur à l'insuline, IRS-1 (Frojdo *et al.* 2009).

En recherchant les facteurs de transcription régulés durant l'hyperinsulinémie chez les sujets sains dont l'expression ne varie pas chez les patients DT2, nous avons identifié 30 gènes dont la réponse à l'insuline est altérée. Afin de comprendre les causes moléculaires des anomalies de régulation de ces 30 gènes, nous avons analysé la présence de sites de liaison potentiels à des facteurs de transcription communs sur leur promoteur.

Parmi les candidats, nous avons identifié le répresseur transcriptionnel BHLHB2, décrit pour jouer un rôle dans diverses fonctions cellulaires, incluant le développement, la

croissance, la différenciation et la mort cellulaire, l'oncogenèse, la régulation de la réponse immunitaire et du rythme circadien (Yamada and Miyamoto 2005). L'étude fonctionnelle des gènes régulés au cours de l'hyperinsulinémie chez les sujets sains indiquent que nombres de ces fonctions cellulaires sont également régulées par l'insuline, notamment la croissance cellulaire et la réponse immune (Rome *et al.* 2003). BHLHB2 pourrait donc être responsable d'une partie des effets de l'insuline dans le muscle squelettique et être ainsi impliqué dans le développement de l'insulino-résistance.

Les résultats que nous présentons dans l'article précédent désignent *BHLHB2* comme un gène cible direct de SREBP-1c, dont le rôle dans la médiation des effets transcriptionnels de l'insuline au sein du muscle squelettique n'est plus à démontrer (Commerford *et al.* 2004; Gosmain *et al.* 2004; Dif *et al.* 2006; Boonsong *et al.* 2007; Nadeau *et al.* 2007). L'expression de BHLHB2 est fortement activée lors de la surexpression de SREBP-1 dans des cellules musculaires humaines en culture primaire. Il en est de même dans des hépatocytes de souris, selon les résultats présentés par un autre laboratoire (Iizuka and Horikawa 2008). BHLHB2 participent-il donc aux effets transcriptionnels répressifs de l'insuline via son activation par SREBP-1 ou est-il une cible « directe » de l'insuline ?

Nos résultats indiquent que BHLHB2 présente la variation d'expression en réponse à l'hyperinsulinémie la plus forte dans le muscle des sujets contrôles. Son induction au cours du clamp est clairement validée par PCR quantitative. Comme dans notre étude, un article récent rapporte l'induction de l'expression de BHLHB2 en réponse à l'insuline dans le muscle squelettique humain (Coletta *et al.* 2008). L'expression de BHLHB2 serait induite par l'activation de la voie PI3Kinase dans le foie de rat (Yamada *et al.* 2003). L'expression de SREBP-1c est également activée par l'insuline via la voie PI3Kinase/PKB (Raghow *et al.* 2008). BHLHB2 pourrait donc être activé par l'insuline directement via la voie PI3Kinase/PKB, ou indirectement via l'activation de SREBP-1c. Une récente étude montre que l'expression de *Srebf1* est réprimée par BHLHB2 en condition d'hypoxie (Choi *et al.* 2008). BHLHB2 pourrait donc exercer un rétrocontrôle négatif sur l'action de SREBP-1 en réponse à l'insuline, en réprimant son expression génique.

Dans le but de déterminer la contribution de BHLHB2 aux effets transcriptionnels de l'insuline, nous avons utilisé les résultats de l'analyse transcriptomique de myotubes humains surexprimant BHLHB2, réalisée dans le cadre de l'article n°2. L'analyse de ces données issues de puces à ADN pangénomiques révèle que 10% des gènes régulés *in vivo* en condition

d'hyperinsulinémie dans le muscle de sujets sains, sont également régulés par la surexpression de BHLHB2 dans les cellules musculaires humaines. Ceci suggère une possible contribution de BHLHB2 dans l'action de l'insuline. La régulation de ces gènes au cours de l'expression forcée de BHLHB2 pouvant résulter de régulation indirecte, nous ne considérons que les gènes porteur d'un site de liaison à BHLHB2 (V\$DEC1 : ACGCGCACCTGCCGG), dont l'expression est inhibée. Ces gènes représentent seulement 22 % de la totalité des gènes réprimés lors de la surexpression de BHLHB2, soit 125 gènes.

L'analyse du promoteur de ces 125 gènes révèle une association significative entre le site de liaison à BHLHB2 et le site de liaison à plusieurs autres facteurs de transcription. Ainsi 60% des gènes considérés comme cibles directes de BHLHB2 contiennent un site SRE, site de liaison aux facteurs SREBP. Ceci vient confirmer l'existence d'une interaction entre la fonction de SREBP-1 et celle de BHLHB2 dans l'action de l'insuline. SREBP-1c est le régulateur principal du métabolisme lipidique, activant l'expression des gènes de la lipogenèse ainsi que l'expression dans le muscle squelettique de la protéine HKII, enzyme clé de la glycolyse. L'interaction entre BHLHB2 et SREBP-1 suggère l'implication de BHLHB2 dans le métabolisme glucido-lipidique musculaire. D'autre part, sur la moitié des gènes cibles de BHLHB2, le motif V\$DEC1 est significativement associé au motif V\$CHRE, site de réponse aux carbohydrates. De plus, une possible interaction entre BHLHB2 et le motif CHRE a été observé sur les promoteurs de gènes clés de la lipogenèse dans le foie. En effet, un rapport récent montre que BHLHB2 inhibe l'expression des gènes lipogéniques induite par l'insuline en bloquant la liaison à l'ADN du facteur de transcription ChREB, Carbohydrate response element binding protein, sur le promoteur du gène de la FAS (Iizuka and Horikawa 2008).

L'ensemble de ces données désigne BHLHB2 comme un nouveau médiateur potentiel des effets de l'insuline sur le métabolisme des lipides et des glucides. Cet aspect métabolique apparaît tout à fait nouveau dans la fonction de BHLHB2, plutôt associé auparavant à la régulation de l'orientation cellulaire : croissance, différenciation, apoptose, régulation du cycle cellulaire. Cependant, tous ces phénomènes s'effectuent en fonction de l'état énergétique de la cellule et sont donc intimement liés à la régulation métabolique. Ainsi, le maintien du phénotype musculaire dépend à la fois du maintien de l'état différencié des fibres musculaires et du maintien de leur orientation métabolique.

Les gènes dont l'expression est inhibée par BHLHB2 présentent un enrichissement significatif en sites de liaison au facteur MEF2, facteur de transcription jouant un rôle majeur au cours du développement musculaire. Ceci concorde avec l'inhibition de l'expression de plusieurs gènes muscle-spécifiques et marqueurs musculaires. En accord avec cette observation, l'activité créatine kinase dans les myotubes surexprimant BHLHB2 est significativement réduite. Ceci laisse supposer que l'altération de l'expression de BHLHB2 chez les patients insulino-résistants est associée à une altération identique de l'activité créatine kinase dans le muscle de ces patients. Or de récentes observations indiquent que le DT2 est associé à des modifications structurales du muscle squelettique, incluant des signes d'atrophie musculaire et une altération de la plasticité des fibres musculaires.

Dans l'article n°2, nous avons montré les effets atrophiques de SREBP-1, *in vitro*, sur des myotubes humains en culture primaire et *in vivo*, sur le muscle squelettique de souris. Nous démontrons que BHLHB2, en tant que répresseurs des gènes muscle-spécifiques, est responsable de ces effets négatifs de SREBP-1 sur le phénotype musculaire. SREBP-1 et BHLHB2, tous deux médiateurs des effets transcriptionnels de l'insuline sur le muscle squelettique et impliqués dans les mécanismes de l'insuline-résistance, pourraient ainsi contribuer au développement des défauts structurels dans le muscle des patients DT2.

**DISCUSSION GENERALE  
ET PERSPECTIVES**





D'abord décrites dans le foie et le tissu adipeux, les deux isoformes de SREBP-1 sont exprimées à des niveaux similaires dans le muscle squelettique humain, comme le confirment les travaux menés au laboratoire. Le rôle des facteurs SREBP-1 dans le muscle squelettique apparaît d'abord identique à celui qu'ils jouent dans le foie et le tissu adipeux, leurs principaux gènes cibles, notamment les enzymes lipogéniques FAS, ACC1 et GPAT, étant activés de la même façon dans ces deux organes que dans le muscle squelettique. SREBP-1 régule donc le métabolisme lipidique musculaire. De plus, l'expression musculaire de SREBP-1c répond aux variations nutritionnelles et à l'insuline, et l'expression de nombreux gènes cibles de l'insuline dans le muscle est directement régulée par SREBP-1c. SREBP-1c apparaît donc comme un médiateur des effets transcriptionnels de l'insuline dans le muscle squelettique, comme dans le foie et le tissu adipeux. Cependant, dans le muscle squelettique, SREBP-1 apparaît également impliqué dans le métabolisme glucidique, régulant l'expression de HKII. De plus, l'expression de SREBP-1c est stimulée dans le muscle squelettique au cours de l'exercice, via une possible activation de la voie MAPKinase directement par la contraction musculaire. Ces données laissent supposer l'existence d'une fonction plus spécifiquement musculaire pour les facteurs SREBP-1a et SREBP-1c.

## **1. Diversité des fonctions de SREBP-1 dans le muscle squelettique**

Afin de définir plus précisément le rôle des facteurs SREBP-1 dans le muscle, mes travaux de thèse se sont d'abord basés sur l'analyse du transcriptome de myotubes humains en culture primaire surexprimant soit SREBP-1a soit SREBP-1c (article n°1).

### **1.1. Implications dans le métabolisme musculaire**

Tout d'abord, cette analyse confirme l'implication fondamentale de SREBP-1 dans le métabolisme musculaire. Ainsi, en tant que régulateurs clé du métabolisme lipidique, les facteurs SREBP-1 régulent l'expression musculaire de nombreux gènes du métabolisme des lipides et du cholestérol. En outre, l'expression de plusieurs gènes du métabolisme des carbohydrates, dont HKII, est également régulée par SREBP-1a et/ou SREBP-1c. De façon intéressante, la surexpression de SREBP-1a et SREBP-1c induit également de nombreuses modifications de l'expression de protéines de la respiration mitochondriale et de l'oxydoréduction. Ainsi, dans le muscle squelettique, les facteurs SREBP-1 participent à la

régulation coordonnée de plusieurs voies métaboliques impliqués dans le contrôle de l'homéostasie énergétique.

Cependant, les gènes annotés « glucose metabolism », « lipid metabolism » et « mitochondrial oxidation » ne représentent que 6 % des gènes régulés par SREBP-1 dans le muscle squelettique (article n°1). Ainsi, SREBP-1a et SREBP-1c prennent part à d'autres fonctions cellulaires essentielles comme la signalisation intracellulaire, la régulation du cytosquelette, le trafic vésiculaire, la régulation du cycle cellulaire. Ces fonctions apparaissent également régulées au cours de clamp hyperinsulinémique-euglycémique, ce qui confirme le rôle de SREBP-1 comme médiateurs des effets transcriptionnels de l'insuline dans le muscle squelettique (Rome *et al.* 2003).

## **1.2. Implications dans la réponse adaptative au stress extracellulaire**

L'étude des interactions de SREBP-1a et SREBP-1c avec d'autres facteurs de transcription révèle également leur implication dans la réponse à l'hypoxie. Plusieurs études précédemment publiées montrent que l'expression de SREBP-1 est activée au cours de l'hypoxie, et induit une hyperlipidémie (Hughes *et al.* 2005; Li *et al.* 2005b; Li *et al.* 2007; Furuta *et al.* 2008). SREBP-1 apparaît également interagir avec les facteurs de réponse au choc thermique, Heat Shock Factor, comme le montre la présence de motifs de liaison à ces facteurs sur le promoteur de nombreux gènes cibles de SREBP-1. De plus, SREBP-1 régule l'expression de protéines chaperonnes Heat Shock Proteins, HSP, dont plusieurs semblent être des cibles directes de SREBP-1a (mis en évidence dans l'article n°1). L'activation de l'expression d'une protéine chaperonne par un autre facteur SREBP, SREBP-2, a été précédemment montrée (Robichon *et al.* 2006).

Les facteurs SREBP-1 apparaissent ainsi impliqués dans la réponse à deux phénomènes de stress cellulaire différents ; l'hypoxie et le choc thermique. De plus, l'étude de l'ontologie des gènes régulés au cours de leur surexpression dans les myotubes humains, montre un enrichissement en gènes impliqués dans la réponse immunitaire, l'inflammation et l'apoptose. Des modifications du niveau cholestérol intracellulaire ont été reportées en situation d'hypoxie chez la levure, en réponse au choc thermique, ainsi qu'au cours de la réponse inflammatoire des cellules endothéliales (Revathi *et al.* 1994; Shack *et al.* 1999; Yeh

*et al.* 2004; Hughes *et al.* 2005). Ces données placent les facteurs SREBP-1 au cœur de la réponse adaptative au stress extracellulaire (Robichon and Dugail 2007).

Cette première partie de mon travail de thèse confirme ainsi le rôle de SREBP-1 dans la régulation du métabolisme musculaire, notamment en réponse à l'insuline, comme premièrement décrit. Mais ce rôle ne se restreint pas seulement au métabolisme lipidique et permet une régulation coordonnée de plusieurs aspects du métabolisme énergétique, incluant les réactions mitochondriales. De plus, SREBP-1 est impliqué dans bien d'autres fonctions cellulaires essentielles et notamment la réponse au stress extracellulaire. Ainsi, dans le muscle squelettique, SREBP-1 apparaît comme un acteur majeur du maintien de l'homéostasie cellulaire.

## **2. BHLHB2 et BHLHB3 : deux nouvelles cibles directes de SREBP-1**

Les facteurs de transcription SREBP sont des activateurs transcriptionnels stimulant l'expression de leurs gènes cibles en se fixant sur des motifs SRE au niveau leur promoteur. Cependant, environ la moitié des gènes régulés par SREBP-1 dans les myotubes humains sont réprimés (article n°1). Quelques études montrent une répression de gènes porteurs de SRE par SREBP-1. Ainsi SREBP-1 inhibe l'activité transcriptionnelle des gènes codant pour la protéine de transfert microsomale MTP et pour la cavéoline en se fixant au niveau de motifs SRE sur leur promoteur. SREBP-1 pourrait réprimer ces gènes en déplaçant de leur promoteur des facteurs de transcription essentiels à leur expression (Bist *et al.* 1997; Sato *et al.* 1999). SREBP-1 peut également réprimer l'activité de ces gènes cibles en recrutant un co-répresseur. Ainsi, le facteur YY1 peut interagir avec SREBP-1 avec une très forte affinité, empêcher le recrutement du co-activateur NFY et ainsi réprimer l'activité transcriptionnelle de gènes cibles de SREBP-1 (Bennett *et al.* 1999; Ericsson *et al.* 1999). Ces mécanismes restent somme toute très peu répandus et il est plus vraisemblable que la répression des gènes cibles de SREBP-1 observée dans le muscle squelettique résulte d'une régulation indirecte par SREBP-1, via l'activation de répresseurs transcriptionnels. Ainsi, 20% des gènes régulés par SREBP-1 dans les myotubes humains sont impliqués dans la régulation transcriptionnelle, dont 110 gènes codant pour d'autres facteurs de transcription (article n°1). Les facteurs SREBP-1 activent donc un vaste réseau de régulation transcriptionnelle indirecte.

Parmi les gènes régulés par SREBP-1, nous avons identifiés deux répresseurs transcriptionnels : BHLHB2 et BHLHB3, appartenant comme les facteurs SREBP à la super-famille des facteurs bHLH. L'expression de ces deux répresseurs est activée par SREBP-1 dans les myoblastes et les myotubes en culture ainsi que dans le muscle de souris surexprimant SREBP-1. L'étude de leur promoteur révèle la présence de motifs SRE sur lesquels SREBP-1 se fixe pour activer directement leur transcription (article n°2). BHLHB2 et BHLHB3 sont donc deux nouveaux gènes cibles directs de SREBP-1 dans le muscle squelettique.

## **2.1. Implications dans le métabolisme musculaire**

L'activation de l'expression de BHLHB2 par SREBP-1 est rapportée par une première étude, dans des hépatocytes de souris surexprimant SREBP-1c (Iizuka and Horikawa 2008). Cette étude montre, en outre, que l'expression de BHLHB2 est également activée par le glucose via le facteur de transcription ChREBP, autre acteur majeur de la régulation du métabolisme lipidique, et en retour inhibe la lipogenèse induite par le glucose.

Les implications de BHLHB2 dans la régulation métabolique sont multiples et tissent de nombreux liens avec la fonction de SREBP-1. Ainsi plusieurs voies de régulations métaboliques régulent à la fois l'expression de BHLHB2 et de SREBP-1. Tout d'abord, comme SREBP-1c, l'expression de BHLHB2 est soumise aux variations nutritionnelles (Horton *et al.* 1998; Kim *et al.* 1998a; Bizeau *et al.* 2003). En effet, après 24 heures de jeûne, l'expression de BHLHB2 dans le foie de souris chute de façon parallèle à celle des enzymes cholestérogéniques hépatiques et s'élève lors de la réalimentation (Kawamoto *et al.* 2006; Noshiro *et al.* 2009). L'expression de SREBP-1c est régulée par le statut nutritionnel via les facteurs de transcription LXR/RXR (Kamei *et al.* 2008). De la même façon, les facteurs LXR activent l'expression de BHLHB2 dans les hépatocytes murins et humains (Noshiro *et al.* 2009). La régulation de SREBP par LXR est sous le contrôle de la kinase AMPK. L'AMPK joue le rôle de détecteur de l'état énergétique de la cellule, activée en fonction du ratio AMP/ATP cellulaire. Une fois, activée, elle inhibe entre autre la lipogenèse en bloquant l'activation de LXR et ainsi l'expression de SREBP-1. De la même façon encore, une étude récente montre l'inhibition de l'expression de BHLHB2 par l'AMPK (Vieira *et al.* 2008).

Enfin, comme SREBP-1, BHLHB2 est régulé par l'insuline dans le muscle squelettique, son expression augmentant au cours d'un clamp hyperinsulinémique-euglycémique dans le muscle de sujets sains (article n°3). De précédentes études montrent l'activation de l'expression de BHLHB2 par l'insuline dans le muscle squelettique. Dans le foie, une des principales actions de l'insuline est l'inhibition de la PEPCK, enzyme contrôlant la néoglucogenèse hépatique. L'activation de SREBP-1c par l'insuline est nécessaire à l'inhibition de la PEPCK (Foretz *et al.* 1999a). La PEPCK est également un gène cible de BHLHB2, l'expression de BHLHB2 inhibant l'activation transcriptionnelle du gène de la PEPCK (Yamada *et al.* 2005). Ainsi, la voie insuline-SREBP-1c-BHLHB2 inhibe la néoglucogenèse hépatique. L'analyse croisée des gènes régulés par l'insuline et des gènes régulés au cours d'une surexpression de BHLHB2 dans le muscle squelettique indique que de nombreux gènes cibles de l'insuline sont des cibles directes de BHLHB2 (article n°3). Ainsi, si SREBP-1 est le médiateur des effets transcriptionnels activateurs de l'insuline, BHLHB2 apparaît comme le médiateur de ces effets transcriptionnels répresseurs.

L'analyse croisée des données issues des puces à ADN réalisé à partir des myotubes surexprimant SREBP-1 et des myotubes surexprimant BHLHB2, révèlent qu'environ 10 % des gènes dont l'expression est inhibée par SREBP-1, sont également réprimés par BHLHB2 (article n°2). De plus l'analyse des promoteurs des gènes cibles de BHLHB2 révèle que 60% des gènes régulés par BHLHB2 possèdent un site SRE (article n°3). SREBP-1 et BHLHB2 appartiennent tous deux à la super-famille des facteurs possédant un domaine de dimérisation bHLH. Les facteurs bHLH agissent sur la transcription de leur gènes cibles sous forment d'homodimères ou d'hétérodimères, souvent en interagissant via leur domaine bHLH (Massari and Murre 2000). Ainsi, SREBP-1 et BHLHB2 pourraient former des hétérodimères et réguler leurs gènes cibles communs en se liant à l'ADN soit au niveau de site liaison à BHLHB2, soit au niveau de site de liaison à SREBP-1. Il est également possible qu'ils interagissent à partir de leurs sites de liaison respectifs, si ceux-ci sont assez proches sur le promoteur. Ce type de mécanismes d'action est décrit pour la régulation de l'expression des gènes cibles des MRF et des facteurs MEF2 (Molkentin *et al.* 1995).

## 2.2. Implications dans la réponse au stress extracellulaire

Si l'activation de BHLHB2 et BHLHB3 par SREBP-1 semble jouer un rôle fondamental dans la régulation de l'homéostasie métabolique, d'autres fonctions cellulaires réunissent l'action de SREBP-1 et de BHLHB2-B3.

Nous avons montré dans la première partie de ce travail, l'implication de SREBP-1 dans la réponse au stress extracellulaire, plus particulièrement dans l'adaptation cellulaire à l'hypoxie et au choc thermique (article n°1).

De nombreuses études rapportent également l'induction de BHLHB2 et BHLHB3 en condition d'hypoxie. En effet, les promoteurs humains des gènes codant pour BHLHB2 et BHLHB3 sont porteurs de sites de réponse à l'hypoxie, HRE, sur lesquels se fixe le facteur HIF, Hypoxia inducible factor pour induire l'expression de BHLHB2 et BHLHB3 (Ivanova *et al.* 2001; Miyazaki *et al.* 2002). En conséquence, l'expression de BHLHB2 et BHLHB3 est étroitement associée au développement tumoral et est élevée dans les lignées de cellules tumorales (Yoon *et al.* 2001; Giatromanolaki *et al.* 2003; Chakrabarti *et al.* 2004; Turley *et al.* 2004; Ivanova *et al.* 2005a; Olbryt *et al.* 2006; Yunokawa *et al.* 2007; Guillaumond *et al.* 2008). BHLHB2 induit également la différenciation chondrogénique et ostéogénique se déroulant en condition hypoxique (Shen *et al.* 1997; Shen *et al.* 2002; MacLean and Kronenberg 2004; Chen *et al.* 2006; Iwata *et al.* 2006). Enfin, l'hypoxie inhibe la différenciation adipogénique via l'activation de BHLHB2. BHLHB2 bloque l'activité transcriptionnelle de C/EBP $\beta$  et C/EBP $\alpha$  et ainsi l'expression de PPAR $\gamma$ , indispensable à la différenciation adipocytaire (Spiegelman *et al.* 1997; Yun *et al.* 2002; Kim *et al.* 2005; Iwata *et al.* 2006; Gulbagci *et al.* 2009).

De plus, Choi *et al.* décrivent un mécanisme d'inhibition de SREBP-1c au cours de l'hypoxie par BHLHB2 et BHLHB3. BHLHB2 et BHLHB3 répriment l'activité promotrice de SREBP-1c en se fixant au niveau de E-Box sur son promoteur, bloquant ainsi la fixation de SREBP-1c lui-même sur son propre promoteur et son auto-activation (Choi *et al.* 2008). Un rétrocontrôle négatif s'établit donc entre SREBP-1 et BHLHB2-B3 au cours de l'hypoxie.

D'autre part, l'analyse transcriptomique de myotubes surexprimant BHLHB2 montre une augmentation de l'expression des protéines HSP, dont DnaJC4, également activée par SREBP-1. BHLHB2 prend donc part également à la réponse au choc thermique (article n°3).

Ces données indiquent que BHLHB2, BHLHB3 et SREBP-1 sont impliqués dans des fonctions cellulaires similaires (stress cellulaire, métabolisme énergétique) et que leur expression est sous le contrôle des mêmes voies de régulation. BHLHB2 et BHLHB3 apparaissent donc comme des médiateurs clés sur la régulation de l'homéostasie cellulaire par SREBP-1 dans le muscle squelettique.

### **3. SREBP-1 : régulateur du phénotype musculaire**

L'analyse transcriptomique des cellules musculaires humaines surexprimant SREBP-1 révèle également l'implication de ces facteurs de transcription dans la régulation de nombreux gènes spécifiquement musculaires (article n°1). En effet, l'étude de l'ontologie des gènes régulés par SREBP-1a et SREBP-1c indique un enrichissement significatif en gènes spécifiquement musculaires. De fait, les gènes de plusieurs facteurs de différenciation musculaire, dont les MRF et MEF2, ainsi que les gènes codant pour de nombreuses protéines sarcomériques voient leur expression inhibée au cours de la surexpression de SREBP-1 (article n°2). SREBP-1 apparaît ainsi directement impliqué dans le contrôle du phénotype musculaire.

En conséquence, nous avons donc étudié le phénotype de myoblastes et de myotubes surexprimant SREBP-1a ou SREBP-1c. La surexpression, *in vitro*, de SREBP-1 dans des myoblastes empêche leur différenciation en myotubes, alors qu'elle induit l'atrophie des myotubes différenciés. Les facteurs SREBP-1 apparaissent ainsi comme des régulateurs négatifs du phénotype musculaire. Ceci est confirmé *in vivo* ; l'infection de muscle squelettique de souris par des adénovirus exprimant SREBP-1a ou SREBP-1c induit une atrophie marquée, associée à une réduction de la taille des fibres musculaires surexprimant SREBP-1.

La différenciation myogénique permet le passage d'un myoblaste non-différencié à un myotube exprimant le phénotype musculaire. Elle prend place au cours de l'embryogenèse ou lors de la régénération musculaire. L'atrophie musculaire est une modification phénotypique réversible des myotubes différenciés qui survient en réponse à différentes situations physiologiques (jeûne, grand âge, inactivité) ou pathologiques (dénervation, cancer,...). Ces deux mécanismes différents partagent cependant des acteurs communs : les MRF.



### 3.1. SREBP inhibe la différenciation myogénique *in vitro*

Le rôle des MRF, MyoD, Myf5, myogénine et MRF4 au cours de la différenciation myogénique n'est plus à démontrer. De nombreuses revues décrivent leurs fonctions respectives au cours de la myogenèse et de la régénération musculaire ; MyoD et Myf5 induisant la détermination des cellules myogéniques alors que la myogénine et MRF4 régulent la différenciation terminale (Francis-West *et al.* 2003; Berkes and Tapscott 2005; Buckingham 2006; Le Grand and Rudnicki 2007; Bryson-Richardson and Currie 2008; Legerlotz and Smith 2008). Les MRF agissent en association avec les facteurs de la famille MEF2. Inhibant l'expression à la fois de MyoD, de la myogénine et de MEF2C dans les myoblastes, aussi bien au niveau génique que protéique, les facteurs SREBP-1 bloquent la différenciation myogénique.

La régulation de la croissance et de la différenciation cellulaire sont les deux principales fonctions des facteurs de transcription appartenant à la super-famille bHLH (Jones 2004). Le facteur SREBP-1c a été d'abord décrit comme facteur induisant la détermination et la différenciation adipogénique, et nommé ADD1 pour Adipocyte Determination and Differentiation factor 1 (Tontonoz *et al.* 1993).

La surexpression d'un tel facteur au sein de myoblastes pourrait-elle induire leur transdifférenciation en adipoblastes ? Alors que la différenciation myogénique est dirigée par les MRF, la différenciation adipogénique est induite par l'activation séquentielle des facteurs C/EBP $\beta$ , C/EBP $\delta$ , ADD1/SREBP-1c puis C/EBP $\alpha$  et PPAR $\gamma$ . En 1995, Hu, Tontonoz et Spiegelman induisent la transdifférenciation de myoblastes G8 en adipoblastes par co-expression ectopique de C/EBP $\alpha$  et PPAR $\gamma$ . L'expression isolée d'un de ces deux facteurs bloque la différenciation myogénique, induite par déplétion en sérum du milieu de culture, mais n'induit pas de modification de phénotype des myoblastes. Au contraire, la co-expression de C/EBP $\alpha$  et PPAR $\gamma$  induit la conversion des cellules myogénique G8 en adipocytes matures, lorsque ces cellules sont placées dans un milieu de différenciation adipogénique (Hu *et al.* 1995). D'autres études ont suivi décrivant la transdifférenciation de myoblastes en cellules adipogéniques. Ainsi, l'exposition de myoblastes dérivées de lignées cellulaires ou issus de cultures primaires, à des activateurs de PPAR $\gamma$ , notamment les thiazolidinediones, TZD, prévient la myogenèse, inhibe l'expression des marqueurs musculaires, comme les MRF et favorise le développement du phénotype adipocytaire. Cependant, les acides gras à longues chaînes, ligands naturels mais faibles activateurs de

PPAR $\gamma$ , s'ils bloquent également la myogenèse, ne parviennent pas modifier le phénotype de C2C12 (Teboul *et al.* 1995; Kausch *et al.* 2001; Holst *et al.* 2003).

La transdifférenciation de myocytes en adipocytes est donc bien décrite au cours d'expériences *in vitro*. Mais peu de choses sont connues sur l'existence d'une telle transdifférenciation *in vivo*. Les cellules musculaires peuvent accumuler des triglycérides et ces triglycérides intramyocytaires, TGIM, sont corrélés au développement de l'insulino-résistance. Pour autant l'accumulation de TGIM n'est pas associée à l'expression de marqueurs adipocytaires. Cependant, la présence de cellules musculaires dont l'apparence est similaire à des adipocytes est rapportée dans des cas de dystrophie musculaire, de myopathies mitochondriales, de cardiomyopathies, d'obésité ou de diabète (Anderson and Kunkel 1992; Knoll *et al.* 1993; d'Amati *et al.* 2000; Slack and Tosh 2001; Holst *et al.* 2003).

Les capacités de SREBP-1c à induire une transdifférenciation myoblastes-adipoblastes, seul ou en association avec d'autres facteurs adipogéniques, en condition favorisant la différenciation adipocytaire, restent à démontrer. L'expression basale des facteurs SREBP-1 étant augmentée dans le muscle squelettique de patients diabétiques de type 2 et obèses, ils pourraient participer à l'apparition des cellules de phénotypes adipocytaires au sein des muscles de ces sujets.

### **3.2. SREBP-1 induit l'atrophie des cellules musculaires *in vitro* et *in vivo***

Le maintien de la masse musculaire résulte d'un équilibre délicat entre synthèse et dégradation des protéines musculaires. Les protéines myofibrillaires représentant 85 % de volume d'une fibre musculaire, toute modification dans l'expression de ces protéines a des répercussions sur la taille des fibres musculaires. Ainsi, la surexpression de SREBP-1 provoquant une diminution drastique de l'expression des protéines sarcomériques Myosine, Titine, et Troponine entraîne une atrophie marquée aussi bien des myotubes humains en culture primaire que des fibres musculaires au sein des muscles squelettiques de souris infectées par adénovirus surexprimant SREBP-1a ou SREBP-1c (article n°2).

La réduction de l'expression des protéines sarcomériques peut résulter de deux mécanismes : soit une augmentation de leur dégradation soit une diminution de leur synthèse.

### 3.2.1. Régulation de la protéolyse

Il est communément admis que l'atrophie musculaire résulte principalement d'une dégradation massive des protéines myofibrillaires, via l'activation du système ubiquitine-protéasome, composant majeur de la machinerie protéolytique des cellules eucaryotes. Les deux principaux acteurs de la protéolyse au cours de l'atrophie musculaire sont les ubiquitine-ligases MAFbx/Atrogine-1 et MuRF-1 (Bodine *et al.* 2001a; Lecker *et al.* 2004). L'expression de ces deux facteurs atrogènes est en effet fortement activée au cours de situations d'atrophie comme la décharge, la dénervation, l'administration de glucocorticoïdes ou la cachexie associée au cancer ou au diabète. Parmi les cibles directes décrites de MAFbx/Atrogine-1 et MuRF-1, on trouve les protéines myofibrillaires Troponine I et Titine, ainsi que MyoD (Lagirand-Cantaloube *et al.* 2009). Leur expression est principalement régulée par le facteur de transcription FOXO (Sandri *et al.* 2004).

La surexpression de SREBP-1 dans des myotubes humains provoque une importante atrophie mais n'induit pas de variations d'expression de FOXO et MAFbx/Atrogine-1 (article n°2). Nous observons par contre une augmentation de l'expression de MuRF-1, indépendamment de l'activation de FOXO. Une autre voie de signalisation a été décrite pour réguler MuRF-1 : la voie NFκB, activée par la cytokine pro-inflammatoire TNFα. L'activation de la voie NFκB provoque une atrophie sévère, observée notamment chez les souris MIKK, exprimant une forme constitutivement active de la kinase IκB Kinase β, contrôlant l'activation de NFκB (Cai *et al.* 2004). Le seul lien démontré entre la voie NFκB et SREBP-1 est leur activation commune par la protéine kinase C atypique αPKC (Sajan *et al.* 2009ab; Sajan *et al.* 2009ba). Il pourrait être intéressant d'observer si la surexpression de SREBP-1 modifie l'activité de la voie NFκB. Sinon, MuRF-1 pourrait être une cible directe de SREBP-1.

L'activité de FOXO, régulant l'expression de MAFbx/Atrogine-1 et MuRF-1, est sous le contrôle de la voie PI3Kinase-AKT. La voie PI3Kinase-AKT joue un rôle central dans le maintien de la masse musculaire, stimulant à la fois la synthèse protéique via l'activation de la kinase mTOR et prévenant la dégradation protéique en inhibant l'activité de FOXO. Cette voie est donc associée à la croissance cellulaire et au contrôle de la taille des organes dans de nombreux modèles : la culture *in vitro* de tissus, les drosophiles et les souris transgéniques. Cette voie a été récemment associée à l'activation des facteurs SREBPs. Ainsi, Portsmann *et al.* montrent d'abord que AKT, d'une part stimule la maturation de SREBP-1 via l'activation

de mTOR et d'autre part stabilise la forme mature de SREBP-1 en inhibant sa phosphorylation par GSK3 $\beta$ , induisant sa dégradation (Porstmann *et al.* 2008). Ils montrent que l'inhibition de SREBP-1 par dominant négatif réduit la taille du corps et des organes de drosophiles transgéniques et inhibe la croissance *in vitro* des cellules issues de ces insectes. SREBP-1 apparaît ainsi comme un médiateur central des effets de la voie PI3Kinase-AKT-mTOR sur la régulation de la croissance cellulaire. De fait, l'étude fonctionnelle des gènes régulés par SREBP-1 dans le muscle squelettique humain révèle que 3 % des gènes cibles de SREBP-1 sont impliqués dans la régulation du cycle cellulaire et la croissance cellulaire (article n°1). Mais la surexpression de SREBP-1, au contraire de son rôle précédemment décrit, inhibe la croissance des cellules musculaires humaines et provoque leur atrophie. Parmi les activateurs de la voie PI3Kinase-AKT, les plus puissants sont le facteur de croissance IGF-1 et l'insuline, également activateurs de SREBP-1. Tous deux sont connus pour leurs robustes effets hypertrophiques. L'effet atrophique de SREBP-1 pourrait constituer un rétrocontrôle permettant de freiner la croissance musculaire induite par les facteurs de croissance.

### **3.2.2. Régulation de la protéosynthèse**

L'atrophie musculaire peut résulter d'une augmentation de la protéolyse mais également d'une réduction de la protéosynthèse. L'expression des gènes muscle-spécifiques, incluant ceux codant pour les protéines myofibrillaires, est sous le contrôle des MRF, en coopération avec les facteurs MEF2. Ainsi l'expression, entre autre, des protéines sarcomériques Troponine, Myosine, Créatine kinase et Desmine nécessite la liaison à leur promoteur des MRF (Lassar *et al.* 1989a; Lin *et al.* 1991; Wentworth *et al.* 1991; Edmondson and Olson 1993; Li and Capetanaki 1993). De plus, une étude récente montre la nécessité de MEF2C au maintien de l'intégrité du sarcomère dans le muscle squelettique (Potthoff *et al.* 2007). La surexpression de SREBP-1, comme dans les myoblastes dont elle inhibe la différenciation, induit une réduction drastique de l'expression des MRF et de MEF2C dans les myotubes différenciées (article n°2). Cette inhibition des MRF est associée à une diminution de l'expression des protéines sarcomériques Titine, Troponine I et Myosine. L'atrophie marquée provoquée par SREBP-1 *in vitro* comme *in vivo* semble donc résulter d'une réduction de la protéosynthèse due à l'inhibition des MRF et de leur partenaire transcriptionnel MEF2C.

Si le rôle des MRF au cours de la différenciation myogénique est bien décrit, leur rôle dans les fibres musculaires matures apparaît moins clair. Leur expression persiste après la différenciation et est sensible aux stimuli induisant l'hypertrophie ou l'atrophie. Ainsi, quelques études montrent une diminution de l'expression de MyoD lors de situation de décharge induisant une fonte musculaire (Loughna and Brownson 1996; Mozdziak *et al.* 1999). Cependant, son expression augmente dans le muscle atrophique dénervé (Voytik *et al.* 1993; Walters *et al.* 2000a; Ishido *et al.* 2004a). Les données de la littérature sont donc contradictoires quant au rôle des MRF au cours de l'atrophie musculaire. Les MRF apparaissent plus clairement impliqués dans la régulation du phénotype des fibres musculaires, MyoD associé à la détermination du phénotype des fibres rapides glycolytiques et la myogénine associée à la détermination du phénotype des fibres lentes oxydatives (Hughes *et al.* 1993; Hughes *et al.* 1999; Bassel-Duby and Olson 2006). L'atrophie musculaire se caractérisant, en plus de la diminution de la taille des fibres musculaires, par une transition du phénotype musculaire lent oxydatif vers le type rapide glycolytique, elle est plus fréquemment associée à une augmentation de l'expression de MyoD (Haddad *et al.* 2003). Ce n'est pas le cas dans le cadre de la surexpression de SREBP-1, SREBP-1 inhibant l'expression de MyoD. La modification d'expression d'un MRF de façon isolée induit une modification phénotypique des fibres musculaires et non leur atrophie, l'activité d'un autre MRF compensant les effets de la perte du premier. Mais l'inhibition simultanée de l'expression de MyoD, de la myogénine et de MEF2C par la surexpression de SREBP-1 provoque des effets drastiques sur le phénotype musculaire, aucun MRF ne pouvant alors soutenir l'expression des protéines muscle-spécifiques.

#### **4. BHLHB2 et BHLHB3 : médiateurs des effets répresseurs de SREBP-1 sur les cellules musculaires**

Nos travaux montrent que SREBP-1 bloque la différenciation myogénique des myoblastes et induit l'atrophie des myotubes en inhibant l'expression des MRF et de MEF2C (article n°2). En tant qu'activateur transcriptionnel, il est peu probable que SREBP-1 réprime directement l'expression de ces gènes. Or, nous avons identifié les répresseurs transcriptionnels BHLHB2 et BHLHB3 comme cibles directes de SREBP-1. Plusieurs études décrivent l'implication de ces répresseurs dans le processus myogénique. Ainsi BHLHB2 apparaît comme un régulateur de l'activation des cellules satellites au cours de la régénération

musculaire, alors que BHLHB3 inhibe la différenciation myogénique (Azmi *et al.* 2003; Azmi *et al.* 2004; Fujimoto *et al.* 2007; Sun *et al.* 2007a).

L'étude transcriptomique de myotubes surexprimant BHLHB2 ou BHLHB3 révèle leur implication dans les mêmes fonctions spécifiquement musculaires que celles régulées par SREBP-1 (article n°2 et n°3). De plus, plus d'un tiers des gènes muscle-spécifiques réprimés par SREBP-1 apparaissent comme des cibles de BHLHB2 et BHLHB3. Ces deux répresseurs transcriptionnels apparaissent donc comme effecteurs de l'inhibition transcriptionnelle des MRF et des facteurs MEF2 par SREBP-1.

En conséquence, la surexpression de BHLHB2 et BHLHB3 dans des myoblastes ou des myotubes humains reproduit les effets de la surexpression de SREBP-1a ou SREBP-1c, inhibant la différenciation myogénique des myoblastes et provoquant une atrophie sévère des myotubes différenciés. De surcroît, l'inhibition de l'expression de BHLHB2 et BHLHB3, restaure d'une part la différenciation myogénique et d'autre part prévient l'atrophie au cours d'une surexpression de SREBP-1 (article n°2).

BHLHB2 et BHLHB3 se dégagent ainsi comme les principaux médiateurs des effets de SREBP-1 sur la détermination et le maintien du phénotype musculaire.

#### **4.1. Implication de BHLHB3 dans la différenciation myogénique**

L'effet anti-myogénique de BHLHB3 est bien démontré. BHLHB3 inhibe la différenciation des cellules C2C12 en myotubes, en réprimant l'expression de la myogénine et MEF2C, supprimant ainsi l'expression des gènes muscle-spécifiques, dont les protéines myofibrillaires (Azmi *et al.* 2004). Ces effets sont identiques à ceux de la surexpression de SREBP-1. En fait, BHLHB3 bloque l'activité transcriptionnelle de MyoD par plusieurs mécanismes : soit par interaction directe empêchant la fixation de MyoD à l'ADN, soit en séquestrant les protéines E-47 et E-12, partenaires transcriptionnels indispensables à l'activité de MyoD, soit en recrutant la déacétylase SIRT1, inhibiteur de l'activité de MyoD (Azmi *et al.* 2003; Fulco *et al.* 2003; Fujimoto *et al.* 2007). Dans ces différentes études, l'expression de MyoD n'est pas modifiée alors que la surexpression de SREBP-1 inhibe également l'expression de MyoD (article n°2). Toutefois, MyoD activant sa propre expression et MEF2C étant nécessaire au maintien de l'expression de MyoD au cours de la différenciation, il n'est pas surprenant qu'en l'absence d'expression de MEF2C et l'activité transcriptionnelle de

MyoD étant bloquée, l'expression de MyoD lui-même ne peut être soutenue dans les cellules surexprimant SREBP-1 (Kaushal *et al.* 1994; Wong *et al.* 1994; Zingg *et al.* 1994; Horwitz 1996).

#### **4.2. Implication de BHLHB2 dans la différenciation myogénique**

BHLHB2 possède les mêmes capacités d'interaction avec MyoD que BHLHB3. De la même façon, il réprime l'activité transcriptionnelle de MyoD en empêchant sa fixation sur le promoteur de ses gènes cibles (Fujimoto *et al.* 2007). L'analyse du promoteur des gènes cibles de BHLHB2 montre que les gènes dont l'expression est inhibée par BHLHB2 présentent un enrichissement significatif en sites de liaison aux facteurs MEF2 (Rome *et al.* 2009). De ce fait, BHLHB2 réprime l'expression de plusieurs gènes cibles des facteurs MEF2. Ces facteurs régulent l'expression des gènes muscle-spécifiques de façon synergique avec les MRF, en interagissant directement avec les dimères MRF-protéines E. BHLHB2 pourrait donc réprimer l'expression des gènes muscle-spécifiques porteurs de site de liaison au MEF2 par son interaction directe avec MyoD et ainsi participer aux effets anti-myogéniques et atrophiques de SREBP-1.

Aucune donnée n'est publiée sur l'action de BHLHB2 sur la différenciation myogénique. En revanche, l'étude des souris BHLHB2<sup>-/-</sup> indique un rôle essentiel de BHLHB2 dans la régulation de l'activation des cellules satellites. Ces souris présentent un défaut de régénération musculaire dû à une prolifération excessive des cellules satellites (Sun *et al.* 2007a). L'activation des cellules satellites puis leur prolifération est stimulée par la voie Notch. Cette voie doit être ensuite inhibée pour permettre la différenciation des cellules satellites. Chez les souris KO BHLHB2, la voie Notch est constamment activée au cours de la régénération musculaire, empêchant la différenciation des cellules satellites qui continuent de proliférer. Les myoblastes des souris BHLHB2<sup>-/-</sup> montre une élévation de l'activité transcriptionnelle de l'effecteur de la voie Notch, le domaine intracellulaire du récepteur Notch, NICD. BHLHB2 inhibe en fait la voie Notch par interaction directe avec NICD, entraînant la répression de ces gènes cibles.

BHLHB2 apparaît donc favoriser la différenciation des cellules satellites et ainsi jouer un rôle essentiel dans la régénération musculaire. Nos résultats, montrant au contraire un rôle inhibiteur de BHLHB2 sur la différenciation myogénique, sont en désaccord avec ces

données. Cependant, notre modèle d'étude est différent : alors que les données de Sun *et al.* sont obtenues à partir de souris déficientes en BHLHB2, nos données sont issues de myotubes humains surexprimant BHLHB2. L'enchaînement des étapes de la régénération musculaire, à savoir l'activation, l'expansion clonale puis la différenciation des cellules satellites, nécessite une régulation fine du cycle cellulaire et de la voie Notch (Vasyutina *et al.* 2007) ; il se peut alors qu'une surexpression de BHLHB2, comme son inhibition, entraîne des perturbations du processus myogénique, comme une sortie précoce du cycle cellulaire.

En conclusion, nos résultats dessinent une nouvelle voie de régulation du phénotype musculaire où l'activation de SREBP-1 induit l'expression des répresseurs transcriptionnels BHLHB2 et BHLHB3, qui, en réprimant principalement l'activité transcriptionnelle de MyoD, inhibent l'expression des MRF et des gènes muscle-spécifiques (Figure 56). Cette inhibition d'une part, bloque la différenciation des myoblastes en myotubes et d'autre part, provoque l'atrophie des myotubes différenciés.

L'analyse croisée des gènes cibles de SREBP-1 et de BHLHB2 et BHLHB3 montre leur implication commune dans plusieurs fonctions cellulaires dont le métabolisme musculaire. Ainsi SREBP-1, BHLHB2 et BHLHB3 se révèlent être des acteurs majeurs dans l'intégration de la régulation de l'homéostasie énergétique au contrôle de la fonction musculaire.



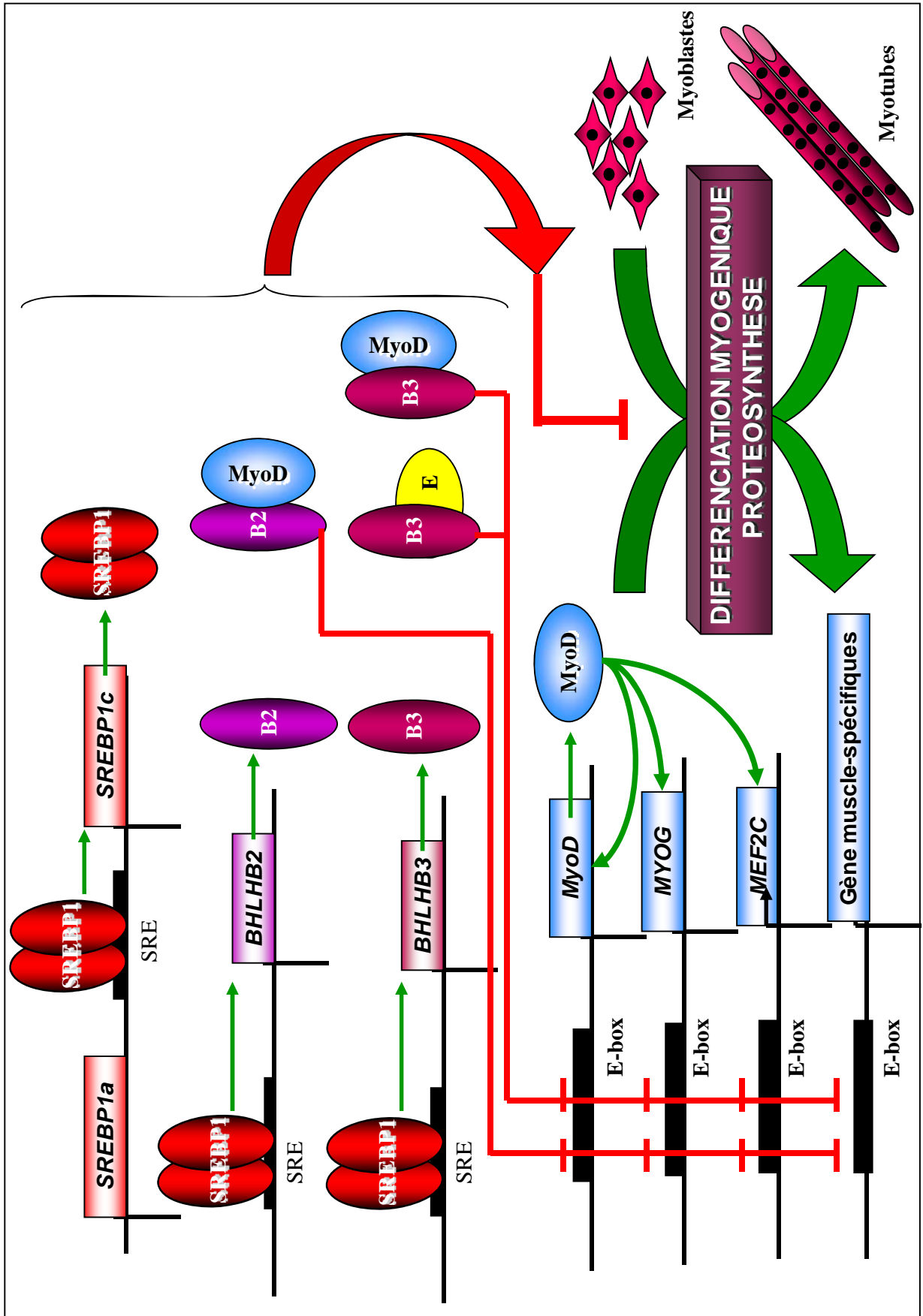


Figure 56: Mécanisme de régulation de la différenciation myogénique et de la protéosynthèse musculaire par SREBP-1

## **5. Implications des effets anti-myogéniques et atrophiques de SREBP-1 dans le développement de pathologies musculaires**

Nous avons montré que la régulation par l'insuline de BHLHB2, comme celle de SREBP-1c est altérée dans le muscle de patients diabétiques de type 2 insulino-résistants (article n°3). La double fonction des facteurs SREBP-1 et BHLHB2-B3, à la fois dans la régulation métabolique et dans le contrôle du phénotype musculaire, mérite naturellement d'être étudiée dans le cadre des maladies métaboliques et des altérations musculaires associées.

Nos travaux confirment le rôle de SREBP-1 et désignent BHLHB2 comme médiateurs effets transcriptionnels de l'insuline dans le muscle squelettique (article n°1 et 3). La régulation par l'insuline de ces deux facteurs est altérée dans le muscle de patients diabétiques de type 2. Cependant, les données de la littérature divergent quant à l'expression basale de SREBP-1c. Si Sewter *et al.* montrent une diminution de l'expression de SREBP-1c dans le muscle squelettique de patients DT2, des données du laboratoire indiquent au contraire une élévation de l'expression basale de SREBP-1 dans le muscle de patients obèses et de patients DT2 (Ducluzeau *et al.* 2001; Sewter *et al.* 2002). De façon concordante, nous trouvons chez ces mêmes patients une augmentation de l'expression basale de BHLHB2 (article n°3). En fait, chez le sujet sain, l'expression musculaire de SREBP-1 est cyclique et subit des variations de grandes amplitudes suivant l'insulinémie, évoluant en fonction du statut nutritionnel de l'individu. Chez les sujets DT2 et obèses, l'insulino-résistance abolie les variations d'expression de SREBP-1 en fonction du statut nutritionnel. L'expression de SREBP-1 devient chronique.

Suivant les études, SREBP-1 serait activé par l'insuline dans le muscle squelettique soit par la voie IRS-1/PI3Kinase/AKT, soit par la voie IRS-2/MAPKinases (Nadeau *et al.* 2004; Gosmain *et al.* 2005; Dif *et al.* 2006; Nadeau *et al.* 2006). L'insulino-résistance résulte d'un défaut de phosphorylation d'IRS-1 entraînant l'inhibition de la voie PI3Kinase/AKT. L'absence de réponse de l'expression de SREBP-1 aux variations de l'insulinémie en aigüe (au cours des repas en situation physiologique ou au cours du clamp hyperinsulinémique) serait due à ce défaut d'activation de la voie PI3Kinase/AKT. En revanche, la voie MAPKinases continue d'être régulée par l'insuline, via IRS-2, dans le muscle squelettique des sujets insulino-résistants. En conséquence, l'élévation de l'expression basale de SREBP-1 et, donc de BHLHB2, chez les sujets obèses et DT2 serait liée à l'activation de la voie

MAPKinasés par l'hyperinsulinémie chronique observée chez ces sujets. Ainsi, les patients DT2 et obèses seraient soumis à une surexpression chronique de SREBP-1.

Une fonte de la masse musculaire a pu être observée dans certains cas de diabète, lorsque l'insulinémie était mal contrôlée. Cette perte musculaire est associée à une élévation de l'excrétion urinaire de 3-méthylhistidine, un acide aminé non métabolisable spécifique des protéines myofibrillaires, indiquant une protéolyse musculaire accrue (Nakhooda *et al.* 1980; Marchesini *et al.* 1982; Lecker *et al.* 1999). Ces effets sont reproduits chez les rats insulinopéniques rendus diabétiques de type 1 par traitement à la streptozotocine, qui développent une atrophie musculaire (Price *et al.* 1996). Dans le muscle squelettique de ces rats, les mêmes gènes atrogéniques sont régulés que dans d'autres modèles animaux d'atrophie. Notamment, l'expression de Atrogène-1 et MuRF-1 est fortement augmentée, signe d'une atrophie sévère (Gomes *et al.* 2001; Lecker *et al.* 2004). Plus fréquemment, une augmentation de la fatigabilité musculaire est observée chez les patients obèses et DT2 (Hickey *et al.* 1995; Merrill *et al.* 1997; Halvatsiotis *et al.* 2002; Ljubisavljevic *et al.* 2009). Cette fatigabilité musculaire accrue s'accompagne d'une réduction des capacités oxydatives du muscle. Elle est due à une transition de phénotype des fibres musculaires d'un type lent oxydatif à un type rapide glycolytique (Lillioja *et al.* 1987; Gaster *et al.* 2001; Oberbach *et al.* 2006). Les fibres rapides glycolytiques, ne pouvant s'appuyer sur l'oxydation du glucose et des lipides comme support énergétique mais seulement sur la glycolyse anaérobie, produisent moins d'énergie que les fibres lentes oxydatives. Cette transition s'accompagne d'une altération de l'expression des MRF, principaux régulateurs du phénotype des fibres musculaires, notamment une diminution d'expression de la myogénine et de MEF2C (Harridge 2007). C'est également un des premiers signes d'atrophie musculaire (Bassel-Duby and Olson 2006; Harridge 2007).

Nos résultats suggèrent que les facteurs SREBP-1 et BHLHB2-B3, dont l'expression basale est augmentée dans le muscle des patients obèses et DT2, pourraient participer à la diminution de la fonction musculaire au cours de ces pathologies.

Certains sujets obèses développent en vieillissant une obésité sarcopénique. La sarcopénie est une conséquence fréquente du vieillissement. Il s'agit d'une perte progressive de la masse et de la force musculaire, provoquée par une diminution du nombre et de la taille des fibres musculaires, ainsi qu'une diminution de la contractilité des fibres intactes. Elle

s'accompagne d'une augmentation de l'infiltration de graisse musculaire (Roubenoff and Hughes 2000). L'obésité accélère la survenue de la sarcopénie, notamment à cause de l'augmentation de la masse grasse au détriment de la masse musculaire (Roubenoff 2000; Stenholm *et al.* 2008; Zamboni *et al.* 2008).

Les deux principales causes avancées pour expliquer le développement de la sarcopénie chez les patients obèses sont l'insulino-résistance et l'état inflammatoire de bas grade associé à l'obésité.

L'insuline est un puissant agent anabolique, activant efficacement la voie PI3K-AKT-mTOR et ainsi la synthèse protéique. Il paraît donc logique que l'insulino-résistance, résultant d'un défaut d'activation de la voie PI3Kinase-AKT, induise une diminution de la masse musculaire. De fait, l'insulino-résistance augmente la protéolyse musculaire chez les souris db/db (Wang *et al.* 2006). La survenue de l'insulino-résistance musculaire est corrélée au taux de TGIM, lui-même corrélé positivement à l'expression de SREBP-1c (Mingrone *et al.* 2003), suggérant l'implication de SREBP-1c dans l'accumulation lipidique au sein des cellules musculaires des sujets insulino-résistants. L'accumulation lipidique au sein du muscle squelettique des patients insulino-résistants est liée à une diminution des capacités oxydatives musculaires, premier signe d'atrophie musculaire. Chez les sujets obèses sarcopéniques, on observe en effet une forte augmentation du taux de TGIM. SREBP-1c pourrait donc être impliqué dans le développement de l'atrophie musculaire chez les sujets obèses.

L'inflammation chronique de bas grade associée au développement de l'obésité est due à la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, entre autre de TNF $\alpha$ , par les adipocytes subissant une surcharge lipidique. Ainsi, une importante élévation de l'expression de TNF $\alpha$  est observée chez les patients obèses et dans tous les modèles animaux d'obésité (Hotamisligil 1999; Pedersen *et al.* 2003; Dirks and Leeuwenburgh 2006). Or les effets atrophiques du TNF $\alpha$  sont connus de longue date. Provoquant une perte musculaire sévère sur de nombreux modèles animaux, son expression est également associée au développement de cachexie au cours du cancer (Argiles and Lopez-Soriano 1999; Coletti *et al.* 2005; Dirks and Leeuwenburgh 2006; Tisdale 2008). Il inhibe également la myogenèse. Son action passe par l'activation de la voie NF $\kappa$ B et l'expression du facteur atrogénique MuRF-1 (Langen *et al.* 2001; Hunter *et al.* 2002; Cai *et al.* 2004). Plusieurs études montrent que le TNF $\alpha$  peut activer l'expression de SREBP-1c en favorisant son clivage dans le foie, les adipocytes ou les cellules endothéliales (Lawler *et al.* 1998; Chatterjee 1999; Ruan *et al.* 2001; Inadera *et al.* 2002;

Endo *et al.* 2007). L'élévation du taux de TNF $\alpha$  chez les patients obèses pourrait conduire à l'élévation de l'expression de SREBP-1 dans le muscle de ces patients, pouvant participer au développement de la sarcopénie.

Enfin, l'hypoxie est un dernier mécanisme pouvant participer au développement de la sarcopénie chez l'obèse. En effet, les obèses souffrent de difficultés respiratoires liées à leur surcharge pondérale extrême. L'apnée du sommeil, se caractérisant par des arrêts respiratoires répétés au cours du sommeil, touchent plus de 50% de la population obèse (Young *et al.* 1993; Punjabi *et al.* 2002). L'apnée du sommeil provoque des périodes d'hypoxie intermittente entraînant de sévères complications métaboliques. Elle est en effet impliquée dans le développement de l'insulino-résistance, de dyslipidémies et de stéatoses hépatiques (Newman *et al.* 2001; Ip *et al.* 2002; McArdle *et al.* 2007). Plusieurs études montrent le rôle causal d'une activation de l'expression de SREBP-1c par l'hypoxie, via le facteur de transcription HIF-1, dans le développement de ces pathologies associées (Li *et al.* 2005a; Li *et al.* 2005b; Li *et al.* 2007; Furuta *et al.* 2008). L'hypoxie active également l'expression de BHLHB2 et BHLHB3 (Miyazaki *et al.* 2002; Turley *et al.* 2004). Le rôle de l'hypoxie chronique dans le développement de l'atrophie musculaire est largement décrit. L'exposition à une hypoxie prolongée, au cours de séjour en haute altitude par exemple, entraîne une perte de poids due à la fonte musculaire (Bigard *et al.* 1991; Abdelmalki *et al.* 1996; Bigard *et al.* 1996; Howald and Hoppeler 2003; Faucher *et al.* 2005). La diminution de la masse musculaire provoquée par l'hypoxie est associée à une transition du phénotype contractile lent vers rapide, chez de jeunes rongeurs (Itoh *et al.* 1990; Itoh *et al.* 1995; Bigard *et al.* 2000). La réduction de la masse musculaire est une des conséquences de la broncho-pneumopathie obstructive, maladie réduisant de façon drastique les capacités respiratoires de l'individu (Jagoe and Engelen 2003). Des données suggèrent que l'atrophie en conditions hypoxique serait due à une diminution de la protéosynthèse, provoquée par une désactivation de la voie AKT-mTOR (Rennie *et al.* 1983; Preedy *et al.* 1985; Arthur *et al.* 2000). Là encore, SREBP-1 et ses effecteurs BHLHB2 et BHLHB3 pourraient être impliqués dans mécanismes conduisant à l'atrophie au cours de l'hypoxie, non seulement dans le cadre de l'obésité sarcopénique mais également dans le cadre de maladies respiratoires.

Ainsi, SREBP-1 et ses effecteurs BHLHB2 et BHLHB3 pourraient être impliqués dans le développement de plusieurs pathologies associant altération de la fonction musculaire et troubles métaboliques.

## 6. Perspectives

Les travaux réalisés au cours de ma thèse mettent en évidence un nouveau rôle de SREBP-1 dans le contrôle du phénotype musculaire. Il est à présent nécessaire de mieux caractériser les mécanismes gouvernant les effets anti-myogéniques et atrophiques de SREBP-1 dans le muscle squelettique.

Le rôle inhibiteur de BHLHB2 et BHLHB3 sur l'expression des MRF est clair au vue de nos résultats, cependant les mécanismes de répression mis en jeu par ces deux facteurs restent incertains (article n°2). Quelques données sont publiées sur l'inhibition de l'activité transcriptionnelle de MyoD par BHLHB2 et BHLHB3. MyoD activant l'expression de la myogénine, et de MEF2C, ce mécanisme peut suffire à expliquer le blocage de l'expression des gènes muscle-spécifiques dans les cellules musculaires surexprimant SREBP-1 ou BHLHB2-B3. Mais BHLHB2 et BHLHB3 pourraient également interagir directement avec les autres MRF, ou inhiber leur expression en se fixant au niveau de leur promoteur. BHLHB2-B3 et SREBP-1 appartenant à la même super-famille bHLH, pourraient se lier directement l'un à l'autre par leur domaine HLH et agir de concert sur l'expression des MRF et autres gènes muscle-spécifiques. Il apparaît donc nécessaire de tester les capacités d'interactions de ces protéines et d'étudier les promoteurs des MRF, MyoD, myogénine et MEF2C dans le but d'identifier de potentiels sites de liaison à SREBP-1 ou BHLHB2-B3, et tester leurs effets sur l'activité promotrice de ces acteurs essentiels de la myogenèse.

Nous montrons que l'inhibition de l'expression des MRF par SREBP-1, via l'action des répresseurs BHLHB2 et BHLB3, bloque la différenciation myogénique des myoblastes humains en culture primaire (article n°2).

Des phénomènes de transdifférenciation myoblastes-adipoblastes ont été observés auparavant à partir de myoblastes surexprimant des facteurs adipogéniques. SREBP-1c/ADD1 ayant été décrit comme un facteur favorisant la détermination et la différenciation adipocytaire, il pourrait être intéressant de caractériser plus précisément le phénotype des myoblastes surexprimant SREBP-1c. Tout d'abord en testant l'accumulation de triglycérides intracellulaires, une des fonctions principales des adipocytes étant le stockage de lipides sous forme de triglycérides. Puis en quantifiant l'expression de marqueurs adipocytaires comme C/EBP $\alpha$  et PPAR $\gamma$ . De précédentes études montrent l'induction de la différenciation adipogénique de myoblastes, cultivés en en présence de dexaméthasone, activant l'expression

de C/EBP  $\beta$ , de thiazolidinediones, inducteur de PPAR $\gamma$  ou surexprimant simultanément C/EBP $\alpha$  et PPAR $\gamma$ 2 (Hu *et al.* 1995; Grimaldi *et al.* 1997; Kausch *et al.* 2001). La transdifférenciation des myoblastes surexprimant SREBP-1c pourrait être activée par l'ajout sur les cellules de milieu de différenciation adipocytaire, contenant de la dexaméthasone, de l'isobutylmethylxanthine (IBMX ou MIX) ou de l'insuline, traitement induisant l'activation des facteurs C/EBP. La co-expression de SREBP-1c avec d'autres facteurs adipogéniques, comme les facteurs C/EBP ou PPAR $\gamma$ , pourrait également favoriser la transdifférenciation myoblastes-adipoblastes.

Une telle transdifférenciation myoblastes-adipoblastes n'a jamais été caractérisée *in vivo*. Cependant, certaines pathologies, dystrophies musculaires, myopathies mitochondriales, cardiomyopathies, obésité ou diabètes, conduisent à l'apparition dans le muscle squelettique des patients de cellules de phénotype adipocytaire (Anderson and Kunkel 1992; Knoll *et al.* 1993; d'Amati *et al.* 2000; Slack and Tosh 2001; Holst *et al.* 2003). Si des données du laboratoire montrent l'augmentation de l'expression basale de SREBP-1a dans le muscle des patients obèses et diabétiques, il pourrait être intéressant de quantifier le niveau d'expression des facteurs SREBP-1 dans les muscles squelettiques de patients dystrophiques, amyotrophiques ou myopathiques. Définir le phénotype des cellules de type adipocytaire observées dans le muscle de ces patients pourrait permettre de déterminer l'implication de SREBP-1c dans une possible transdifférenciation cellules satellites-adipocytes, *in vivo*.

Si le rôle des MRF au cours de la différenciation myogénique est bien admis, leur rôle au cours de l'atrophie musculaire doit être clarifié. L'inhibition isolée de MyoD ou de la myogénine induit une transition du phénotype musculaire contractile lent vers rapide ou rapide vers lents respectivement. Mais l'inhibition simultanée de ces deux MFR essentiels au maintien du phénotype musculaire n'a jamais été testée, ainsi que l'inhibition des facteurs MEF2, leur partenaires transcriptionnels privilégiés. Cette inhibition pourrait conduire à une suppression de l'expression de la plupart des gènes muscle-spécifiques, ceci étant quasiment tous sous contrôle d'au moins un des MRF. L'atrophie musculaire devrait être testée après inhibition de plusieurs facteurs myogéniques, *in vitro*, grâce à l'utilisation de siRNA, et *in vivo*, par électro-transfert de shRNA, dans le muscle de souris.

Nos travaux désignent donc SREBP-1 comme le facteur intégrateur de la régulation métabolique au contrôle de la fonction musculaire. Or le phénotype musculaire s'adapte constamment aux variations de la demande énergétique, en fonction de la nutrition et de

l'activité physique de l'individu. Quelles seraient alors les conséquences à long terme d'une surexpression chronique de SREBP-1 sur le métabolisme musculaire et le maintien de l'homéostasie énergétique de l'organisme ? Au contraire, quelles seraient les conséquences de la déficience en SREBP-1 sur l'adaptation du phénotype musculaire aux variations métaboliques et à l'exercice ? SREBP-1 est reconnu comme un acteur essentiel de l'action de l'insuline sur le muscle squelettique. Sa surexpression ou son invalidation dans le muscle pourrait-elle alors en modifier l'insulino-sensibilité ? Les effets de SREBP-1 sur le phénotype musculaire métabolique et contractile seraient-ils réversibles ?

Afin d'apporter des réponses à ces différentes questions, un modèle de souris transgéniques est en cours de réalisation au laboratoire. Ce modèle associe le système d'expression inductible (Tet-On), à un promoteur muscle spécifique, comme celui de la créatine kinase musculaire, MCK. Ce système permettra d'obtenir une surexpression inductible et réversible de SREBP-1a ou SREBP-1c, spécifiquement dans le muscle squelettique des souris transgéniques. L'application de ce même système à l'expression d'un dominant négatif de SREBP-1 conduira à l'obtention de souris transgéniques déficientes en SREBP-1 musculaire. L'étude du phénotype musculaire de ces souris transgéniques devrait nous renseigner sur le rôle physiologique de SREBP-1 dans la fonction musculaire.

Enfin, il convient de replacer l'impact de SREBP-1 sur le contrôle de la fonction musculaire dans un contexte physiopathologique. SREBP-1, ainsi que BHLHB2 et BHLHB3, responsables, en partie au moins, de ses effets transcriptionnels répresseurs au sein du muscle, agissent au carrefour de la régulation métabolique et de la régulation du phénotype musculaire. Nos travaux montrent l'implication de SREBP-1 et de BHLHB2 dans les mécanismes de l'insulino-résistance liée aux maladies métaboliques, diabète et obésité (article n°3). Des altérations de la fonction musculaire peuvent survenir au cours de ces maladies, de l'apparition d'une fatigabilité musculaire accrue au développement d'une sarcopénie sévère. L'effet atrophique de SREBP-1, mettant en jeu l'activation des répresseurs transcriptionnels BHLHB2 et BHLHB3, pourrait être impliqué dans l'apparition des dysfonctions musculaires au cours de ces maladies métaboliques. Afin de tester cette hypothèse, l'expression de SREBP-1 pourrait être quantifiée dans les muscles squelettiques de patients obèses sarcopéniques et de patients diabétiques souffrant de troubles musculaires, en conditions basales mais également en conditions d'exercice. L'entraînement en endurance par exemple est reconnu pour améliorer à la fois l'insulino-résistance et les capacités musculaires, et moduler l'expression de SREBP-1c. Le développement de troubles musculaires associées à



des troubles métaboliques pourrait être également étudié sur des modèles animaux de diabète de type 2 et d'obésité, comme les rats nourris par un régime riche en gras et en sucre ou les modèles génétiques d'obésité développant spontanément une insulino-résistance, souris ob/ob, db/db ou rats Zucker fa/fa. Il serait, en outre, intéressant d'étudier, dans ces différents modèles d'insulino-résistance ainsi que chez les patients insulino-résistants, quels seraient les effets sur le phénotype musculaire de la restauration de l'expression cyclique de SREBP-1, notamment par des interventions connues pour améliorer l'insulino-sensibilité : régime nutritionnel ou exercice physique de différentes intensités.

# **BIBLIOGRAPHIE**



## A.

- Aas, V., E. T. Kase, R. Solberg, J. Jensen and A. C. Rustan (2004). "Chronic hyperglycaemia promotes lipogenesis and triacylglycerol accumulation in human skeletal muscle cells." *Diabetologia* **47**(8): 1452-61.
- Abdelmalki, A., S. Fimbel, M. H. Mayet-Sornay, B. Sempore and R. Favier (1996). "Aerobic capacity and skeletal muscle properties of normoxic and hypoxic rats in response to training." *Pflugers Arch* **431**(5): 671-9.
- Adams, C. M., J. L. Goldstein and M. S. Brown (2003). "Cholesterol-induced conformational change in SCAP enhanced by Insig proteins and mimicked by cationic amphiphiles." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(19): 10647-52.
- Adams, G. R. (2006). "Satellite cell proliferation and skeletal muscle hypertrophy." *Appl Physiol Nutr Metab* **31**(6): 782-90.
- Adams, G. R., V. J. Caiozzo, F. Haddad and K. M. Baldwin (2002). "Cellular and molecular responses to increased skeletal muscle loading after irradiation." *Am J Physiol Cell Physiol* **283**(4): C1182-95.
- Adams, G. R., F. Haddad and K. M. Baldwin (1999). "Time course of changes in markers of myogenesis in overloaded rat skeletal muscles." *J Appl Physiol* **87**(5): 1705-12.
- Alway, S. E., H. Degens, G. Krishnamurthy and C. A. Smith (2002a). "Potential role for Id myogenic repressors in apoptosis and attenuation of hypertrophy in muscles of aged rats." *Am J Physiol Cell Physiol* **283**(1): C66-76.
- Alway, S. E., H. Degens, D. A. Lowe and G. Krishnamurthy (2002b). "Increased myogenic repressor Id mRNA and protein levels in hindlimb muscles of aged rats." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **282**(2): R411-22.
- Alway, S. E., J. K. Martyn, J. Ouyang, A. Chaudhrai and Z. S. Murlasits (2003). "Id2 expression during apoptosis and satellite cell activation in unloaded and loaded quail skeletal muscles." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **284**(2): R540-9.
- Amemiya-Kudo, M., H. Shimano, A. H. Hasty, N. Yahagi, T. Yoshikawa, T. Matsuzaka, H. Okazaki, Y. Tamura, Y. Iizuka, K. Ohashi, J. Osuga, K. Harada, T. Gotoda, R. Sato, S. Kimura, S. Ishibashi and N. Yamada (2002). "Transcriptional activities of nuclear SREBP-1a, -1c, and -2 to different target promoters of lipogenic and cholesterogenic genes." *J Lipid Res* **43**(8): 1220-35.
- Amthor, H., B. Christ, M. Weil and K. Patel (1998). "The importance of timing differentiation during limb muscle development." *Curr Biol* **8**(11): 642-52.
- Amthor, H., R. Macharia, R. Navarrete, M. Schuelke, S. C. Brown, A. Otto, T. Voit, F. Muntoni, G. Vrbova, T. Partridge, P. Zammit, L. Bungler and K. Patel (2007). "Lack of myostatin results in excessive muscle growth but impaired force generation." *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(6): 1835-40.
- Anai, M., M. Funaki, T. Ogihara, J. Terasaki, K. Inukai, H. Katagiri, Y. Fukushima, Y. Yazaki, M. Kikuchi, Y. Oka and T. Asano (1998). "Altered expression levels and impaired steps in the pathway to phosphatidylinositol 3-kinase activation via insulin receptor substrates 1 and 2 in Zucker fatty rats." *Diabetes* **47**(1): 13-23.
- Andersen, P. H., S. Lund, H. Vestergaard, S. Junker, B. B. Kahn and O. Pedersen (1993). "Expression of the major insulin regulatable glucose transporter (GLUT4) in skeletal muscle of noninsulin-dependent diabetic patients and healthy subjects before and after insulin infusion." *J Clin Endocrinol Metab* **77**(1): 27-32.
- Anderson, M. S. and L. M. Kunkel (1992). "The molecular and biochemical basis of Duchenne muscular dystrophy." *Trends Biochem Sci* **17**(8): 289-92.
- Andreelli, F., M. Laville, P. H. Ducluzeau, N. Vega, P. Vallier, Y. Khalfallah, J. P. Riou and H. Vidal (1999). "Defective regulation of phosphatidylinositol-3-kinase gene expression in skeletal muscle and adipose tissue of non-insulin-dependent diabetes mellitus patients." *Diabetologia* **42**(3): 358-64.
- Andreolas, C., G. da Silva Xavier, F. Diraison, C. Zhao, A. Varadi, F. Lopez-Casillas, P. Ferre, F. Foufelle and G. A. Rutter (2002). "Stimulation of acetyl-CoA carboxylase gene expression by glucose requires insulin release and sterol regulatory element binding protein 1c in pancreatic MIN6 beta-cells." *Diabetes* **51**(8): 2536-45.
- Argiles, J. M. and F. J. Lopez-Soriano (1999). "The role of cytokines in cancer cachexia." *Med Res Rev* **19**(3): 223-48.
- Arito, M., T. Horiba, S. Hachimura, J. Inoue and R. Sato (2008). "Growth factor-induced phosphorylation of sterol regulatory element-binding proteins inhibits sumoylation, thereby stimulating the expression of their target genes, low density lipoprotein uptake, and lipid synthesis." *J Biol Chem* **283**(22): 15224-31.
- Arnold, H. H. and T. Braun (1996). "Targeted inactivation of myogenic factor genes reveals their role during mouse myogenesis: a review." *Int J Dev Biol* **40**(1): 345-53.
- Arthur, P. G., J. J. Giles and C. M. Wakeford (2000). "Protein synthesis during oxygen conformance and severe hypoxia in the mouse muscle cell line C2C12." *Biochim Biophys Acta* **1475**(1): 83-9.

- Asakura, A., G. E. Lyons and S. J. Tapscott (1995). "The regulation of MyoD gene expression: conserved elements mediate expression in embryonic axial muscle." Dev Biol **171**(2): 386-98.
- Atchley, W. R. and W. M. Fitch (1997). "A natural classification of the basic helix-loop-helix class of transcription factors." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(10): 5172-6.
- Azmi, S., A. Ozog and R. Taneja (2004). "Sharp-1/DEC2 inhibits skeletal muscle differentiation through repression of myogenic transcription factors." J Biol Chem **279**(50): 52643-52.
- Azmi, S., H. Sun, A. Ozog and R. Taneja (2003). "mSharp-1/DEC2, a basic helix-loop-helix protein functions as a transcriptional repressor of E box activity and Stra13 expression." J Biol Chem **278**(22): 20098-109.
- Azmi, S. and R. Taneja (2002). "Embryonic expression of mSharp-1/mDEC2, which encodes a basic helix-loop-helix transcription factor." Mech Dev **114**(1-2): 181-5.
- Azzout-Marniche, D., D. Becard, C. Guichard, M. Foretz, P. Ferre and F. Foufelle (2000). "Insulin effects on sterol regulatory-element-binding protein-1c (SREBP-1c) transcriptional activity in rat hepatocytes." Biochem J **350 Pt 2**: 389-93.

## B.

- Bamman, M. M., J. K. Petrella, J. S. Kim, D. L. Mayhew and J. M. Cross (2007). "Cluster analysis tests the importance of myogenic gene expression during myofiber hypertrophy in humans." J Appl Physiol **102**(6): 2232-9.
- Barthel, A., D. Schmoll and T. G. Unterman (2005). "FoxO proteins in insulin action and metabolism." Trends Endocrinol Metab **16**(4): 183-9.
- Bassel-Duby, R. and E. N. Olson (2006). "Signaling pathways in skeletal muscle remodeling." Annu Rev Biochem **75**: 19-37.
- Ben-Yair, R. and C. Kalcheim (2005). "Lineage analysis of the avian dermomyotome sheet reveals the existence of single cells with both dermal and muscle progenitor fates." Development **132**(4): 689-701.
- Bengal, E., L. Ransone, R. Scharfmann, V. J. Dwarki, S. J. Tapscott, H. Weintraub and I. M. Verma (1992). "Functional antagonism between c-Jun and MyoD proteins: a direct physical association." Cell **68**(3): 507-19.
- Bennett, A. M. and N. K. Tonks (1997). "Regulation of distinct stages of skeletal muscle differentiation by mitogen-activated protein kinases." Science **278**(5341): 1288-91.
- Bennett, M. K., J. M. Lopez, H. B. Sanchez and T. F. Osborne (1995). "Sterol regulation of fatty acid synthase promoter. Coordinate feedback regulation of two major lipid pathways." J Biol Chem **270**(43): 25578-83.
- Bennett, M. K., T. T. Ngo, J. N. Athanikar, J. M. Rosenfeld and T. F. Osborne (1999). "Co-stimulation of promoter for low density lipoprotein receptor gene by sterol regulatory element-binding protein and Sp1 is specifically disrupted by the yin yang 1 protein." J Biol Chem **274**(19): 13025-32.
- Bennett, M. K. and T. F. Osborne (2000). "Nutrient regulation of gene expression by the sterol regulatory element binding proteins: increased recruitment of gene-specific coregulatory factors and selective hyperacetylation of histone H3 in vivo." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(12): 6340-4.
- Bergman, B. C., G. E. Butterfield, E. E. Wolfel, G. A. Casazza, G. D. Lopaschuk and G. A. Brooks (1999). "Evaluation of exercise and training on muscle lipid metabolism." Am J Physiol **276**(1 Pt 1): E106-17.
- Bergstrom, D. A. and S. J. Tapscott (2001). "Molecular distinction between specification and differentiation in the myogenic basic helix-loop-helix transcription factor family." Mol Cell Biol **21**(7): 2404-12.
- Berkes, C. A. and S. J. Tapscott (2005). "MyoD and the transcriptional control of myogenesis." Semin Cell Dev Biol **16**(4-5): 585-95.
- Bigard, A. X., A. Brunet, C. Y. Guezennec and H. Monod (1991). "Skeletal muscle changes after endurance training at high altitude." J Appl Physiol **71**(6): 2114-21.
- Bigard, A. X., P. Douce, D. Merino, F. Lienhard and C. Y. Guezennec (1996). "Changes in dietary protein intake fail to prevent decrease in muscle growth induced by severe hypoxia in rats." J Appl Physiol **80**(1): 208-15.
- Bigard, A. X., H. Sanchez, O. Birot and B. Serrurier (2000). "Myosin heavy chain composition of skeletal muscles in young rats growing under hypobaric hypoxia conditions." J Appl Physiol **88**(2): 479-86.
- Bist, A., P. E. Fielding and C. J. Fielding (1997). "Two sterol regulatory element-like sequences mediate up-regulation of caveolin gene transcription in response to low density lipoprotein free cholesterol." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(20): 10693-8.
- Bizeau, M. E., P. S. MacLean, G. C. Johnson and Y. Wei (2003). "Skeletal muscle sterol regulatory element binding protein-1c decreases with food deprivation and increases with feeding in rats." J Nutr **133**(6): 1787-92.
- Black, B. L., J. F. Martin and E. N. Olson (1995). "The mouse MRF4 promoter is trans-activated directly and indirectly by muscle-specific transcription factors." J Biol Chem **270**(7): 2889-92.

- Blackwell, T. K., J. Huang, A. Ma, L. Kretzner, F. W. Alt, R. N. Eisenman and H. Weintraub (1993). "Binding of myc proteins to canonical and noncanonical DNA sequences." *Mol Cell Biol* **13**(9): 5216-24.
- Blackwell, T. K., L. Kretzner, E. M. Blackwood, R. N. Eisenman and H. Weintraub (1990). "Sequence-specific DNA binding by the c-Myc protein." *Science* **250**(4984): 1149-51.
- Blackwell, T. K. and H. Weintraub (1990). "Differences and similarities in DNA-binding preferences of MyoD and E2A protein complexes revealed by binding site selection." *Science* **250**(4984): 1104-10.
- Bober, E., G. E. Lyons, T. Braun, G. Cossu, M. Buckingham and H. H. Arnold (1991). "The muscle regulatory gene, Myf-6, has a biphasic pattern of expression during early mouse development." *J Cell Biol* **113**(6): 1255-65.
- Bodine, S. C., E. Latres, S. Baumhueter, V. K. Lai, L. Nunez, B. A. Clarke, W. T. Poueymirou, F. J. Panaro, E. Na, K. Dharmarajan, Z. Q. Pan, D. M. Valenzuela, T. M. DeChiara, T. N. Stitt, G. D. Yancopoulos and D. J. Glass (2001a). "Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy." *Science* **294**(5547): 1704-8.
- Bodine, S. C., T. N. Stitt, M. Gonzalez, W. O. Kline, G. L. Stover, R. Bauerlein, E. Zlotchenko, A. Scrimgeour, J. C. Lawrence, D. J. Glass and G. D. Yancopoulos (2001b). "Akt/mTOR pathway is a crucial regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy in vivo." *Nat Cell Biol* **3**(11): 1014-9.
- Bonen, A., M. L. Parolin, G. R. Steinberg, J. Calles-Escandon, N. N. Tandon, J. F. Glatz, J. J. Luiken, G. J. Heigenhauser and D. J. Dyck (2004). "Triacylglycerol accumulation in human obesity and type 2 diabetes is associated with increased rates of skeletal muscle fatty acid transport and increased sarcolemmal FAT/CD36." *Faseb J* **18**(10): 1144-6.
- Boonsong, T., L. Norton, K. Chokkalingam, K. Jewell, I. Macdonald, A. Bennett and K. Tsintzas (2007). "Effect of exercise and insulin on SREBP-1c expression in human skeletal muscle: potential roles for the ERK1/2 and Akt signalling pathways." *Biochem Soc Trans* **35**(Pt 5): 1310-1.
- Borycki, A. G., B. Brunk, S. Tajbakhsh, M. Buckingham, C. Chiang and C. P. Emerson, Jr. (1999). "Sonic hedgehog controls epaxial muscle determination through Myf5 activation." *Development* **126**(18): 4053-63.
- Botolin, D., Y. Wang, B. Christian and D. B. Jump (2006). "Docosahexanoic acid (22:6,n-3) regulates rat hepatocyte SREBP-1 nuclear abundance by Erk- and 26S proteasome-dependent pathways." *J Lipid Res* **47**(1): 181-92.
- Boudjelal, M., R. Taneja, S. Matsubara, P. Bouillet, P. Dolle and P. Chambon (1997). "Overexpression of Stra13, a novel retinoic acid-inducible gene of the basic helix-loop-helix family, inhibits mesodermal and promotes neuronal differentiation of P19 cells." *Genes Dev* **11**(16): 2052-65.
- Bouzakri, K., M. Roques, P. Gual, S. Espinosa, F. Guebre-Egziabher, J. P. Riou, M. Laville, Y. Le Marchand-Brustel, J. F. Tanti and H. Vidal (2003). "Reduced activation of phosphatidylinositol-3 kinase and increased serine 636 phosphorylation of insulin receptor substrate-1 in primary culture of skeletal muscle cells from patients with type 2 diabetes." *Diabetes* **52**(6): 1319-25.
- Brand-Saberi, B. and B. Christ (2000). "Evolution and development of distinct cell lineages derived from somites." *Curr Top Dev Biol* **48**: 1-42.
- Braun, T. and H. H. Arnold (1991). "The four human muscle regulatory helix-loop-helix proteins Myf3-Myf6 exhibit similar hetero-dimerization and DNA binding properties." *Nucleic Acids Res* **19**(20): 5645-51.
- Braun, T. and H. H. Arnold (1995). "Inactivation of Myf-6 and Myf-5 genes in mice leads to alterations in skeletal muscle development." *Embo J* **14**(6): 1176-86.
- Braun, T., E. Bober, M. A. Rudnicki, R. Jaenisch and H. H. Arnold (1994). "MyoD expression marks the onset of skeletal myogenesis in Myf-5 mutant mice." *Development* **120**(11): 3083-92.
- Braun, T., E. Bober, B. Winter, N. Rosenthal and H. H. Arnold (1990). "Myf-6, a new member of the human gene family of myogenic determination factors: evidence for a gene cluster on chromosome 12." *Embo J* **9**(3): 821-31.
- Braun, T., G. Buschhausen-Denker, E. Bober, E. Tannich and H. H. Arnold (1989). "A novel human muscle factor related to but distinct from MyoD1 induces myogenic conversion in 10T1/2 fibroblasts." *Embo J* **8**(3): 701-9.
- Braun, T., M. A. Rudnicki, H. H. Arnold and R. Jaenisch (1992). "Targeted inactivation of the muscle regulatory gene Myf-5 results in abnormal rib development and perinatal death." *Cell* **71**(3): 369-82.
- Brennan, T. J., T. Chakraborty and E. N. Olson (1991). "Mutagenesis of the myogenin basic region identifies an ancient protein motif critical for activation of myogenesis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(13): 5675-9.
- Briggs, M. R., C. Yokoyama, X. Wang, M. S. Brown and J. L. Goldstein (1993). "Nuclear protein that binds sterol regulatory element of low density lipoprotein receptor promoter. I. Identification of the protein and delineation of its target nucleotide sequence." *J Biol Chem* **268**(19): 14490-6.
- Brown, A. J., L. Sun, J. D. Feramisco, M. S. Brown and J. L. Goldstein (2002). "Cholesterol addition to ER membranes alters conformation of SCAP, the SREBP escort protein that regulates cholesterol metabolism." *Mol Cell* **10**(2): 237-45.

- Brown, M. S. and J. L. Goldstein (1997). "The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor." *Cell* **89**(3): 331-40.
- Brown, M. S. and J. L. Goldstein (1998). "Sterol regulatory element binding proteins (SREBPs): controllers of lipid synthesis and cellular uptake." *Nutr Rev* **56**(2 Pt 2): S1-3; discussion S54-75.
- Brown, M. S. and J. L. Goldstein (1999). "A proteolytic pathway that controls the cholesterol content of membranes, cells, and blood." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(20): 11041-8.
- Brown, M. S., J. Ye, R. B. Rawson and J. L. Goldstein (2000). "Regulated intramembrane proteolysis: a control mechanism conserved from bacteria to humans." *Cell* **100**(4): 391-8.
- Brun, R. P., J. B. Kim, E. Hu, S. Altiok and B. M. Spiegelman (1996). "Adipocyte differentiation: a transcriptional regulatory cascade." *Curr Opin Cell Biol* **8**(6): 826-32.
- Bryson-Richardson, R. J. and P. D. Currie (2008). "The genetics of vertebrate myogenesis." *Nat Rev Genet* **9**(8): 632-46.
- Buchberger, A., K. Ragge and H. H. Arnold (1994). "The myogenin gene is activated during myocyte differentiation by pre-existing, not newly synthesized transcription factor MEF-2." *J Biol Chem* **269**(25): 17289-96.
- Buckingham, M. (1992). "Making muscle in mammals." *Trends Genet* **8**(4): 144-8.
- Buckingham, M. (2001). "Skeletal muscle formation in vertebrates." *Curr Opin Genet Dev* **11**(4): 440-8.
- Buckingham, M. (2006). "Myogenic progenitor cells and skeletal myogenesis in vertebrates." *Curr Opin Genet Dev* **16**(5): 525-32.
- Buckingham, M. (2007). "Skeletal muscle progenitor cells and the role of Pax genes." *C R Biol* **330**(6-7): 530-3.
- Buckingham, M., L. Bajard, T. Chang, P. Daubas, J. Hadchouel, S. Meilhac, D. Montarras, D. Rocancourt and F. Relaix (2003). "The formation of skeletal muscle: from somite to limb." *J Anat* **202**(1): 59-68.
- Buckingham, M. and D. Montarras (2008). "Skeletal muscle stem cells." *Curr Opin Genet Dev* **18**(4): 330-6.
- Buckingham, M. and F. Relaix (2007). "The role of Pax genes in the development of tissues and organs: Pax3 and Pax7 regulate muscle progenitor cell functions." *Annu Rev Cell Dev Biol* **23**: 645-73.

## C.

- Cagen, L. M., X. Deng, H. G. Wilcox, E. A. Park, R. Raghov and M. B. Elam (2005). "Insulin activates the rat sterol-regulatory-element-binding protein 1c (SREBP-1c) promoter through the combinatorial actions of SREBP, LXR, Sp-1 and NF-Y cis-acting elements." *Biochem J* **385**(Pt 1): 207-16.
- Cai, D., J. D. Frantz, N. E. Tawa, Jr., P. A. Melendez, B. C. Oh, H. G. Lidov, P. O. Hasselgren, W. R. Frontera, J. Lee, D. J. Glass and S. E. Shoelson (2004). "IKKbeta/NF-kappaB activation causes severe muscle wasting in mice." *Cell* **119**(2): 285-98.
- Carson, J. A. and F. W. Booth (1998). "Myogenin mRNA is elevated during rapid, slow, and maintenance phases of stretch-induced hypertrophy in chicken slow-tonic muscle." *Pflugers Arch* **435**(6): 850-8.
- Castella, P., S. Sawai, K. Nakao, J. A. Wagner and M. Caudy (2000). "HES-1 repression of differentiation and proliferation in PC12 cells: role for the helix 3-helix 4 domain in transcription repression." *Mol Cell Biol* **20**(16): 6170-83.
- Cenciarelli, C., F. De Santa, P. L. Puri, E. Mattei, L. Ricci, F. Bucci, A. Felsani and M. Caruso (1999). "Critical role played by cyclin D3 in the MyoD-mediated arrest of cell cycle during myoblast differentiation." *Mol Cell Biol* **19**(7): 5203-17.
- Chahal, J., C. C. Chen, M. J. Rane, J. P. Moore, M. T. Barati, Y. Song and B. C. Villafuerte (2008). "Regulation of insulin-response element binding protein-1 in obesity and diabetes: potential role in impaired insulin-induced gene transcription." *Endocrinology* **149**(10): 4829-36.
- Chakrabarti, J., H. Turley, L. Campo, C. Han, A. L. Harris, K. C. Gatter and S. B. Fox (2004). "The transcription factor DEC1 (stra13, SHARP2) is associated with the hypoxic response and high tumour grade in human breast cancers." *Br J Cancer* **91**(5): 954-8.
- Chakraborty, T., T. Brennan and E. Olson (1991). "Differential trans-activation of a muscle-specific enhancer by myogenic helix-loop-helix proteins is separable from DNA binding." *J Biol Chem* **266**(5): 2878-82.
- Chatterjee, S. (1999). "Neutral sphingomyelinase: past, present and future." *Chem Phys Lipids* **102**(1-2): 79-96.
- Chaussade, C., L. Pirola, S. Bonnafous, F. Blondeau, S. Brenz-Verca, H. Tronchere, F. Portis, S. Rusconi, B. Payrastra, J. Laporte and E. Van Obberghen (2003). "Expression of myotubularin by an adenoviral vector demonstrates its function as a phosphatidylinositol 3-phosphate [PtdIns(3)P] phosphatase in muscle cell lines: involvement of PtdIns(3)P in insulin-stimulated glucose transport." *Mol Endocrinol* **17**(12): 2448-60.
- Chavez, J. A. and S. A. Summers (2003). "Characterizing the effects of saturated fatty acids on insulin signaling and ceramide and diacylglycerol accumulation in 3T3-L1 adipocytes and C2C12 myotubes." *Arch Biochem Biophys* **419**(2): 101-9.

- Chen, G., G. Liang, J. Ou, J. L. Goldstein and M. S. Brown (2004). "Central role for liver X receptor in insulin-mediated activation of Srebp-1c transcription and stimulation of fatty acid synthesis in liver." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(31): 11245-50.
- Chen, L., T. Fink, P. Ebbesen and V. Zachar (2006). "Hypoxic treatment inhibits insulin-induced chondrogenesis of ATDC5 cells despite upregulation of DEC1." Connect Tissue Res **47**(3): 119-23.
- Chiang, C., Y. Litingtung, E. Lee, K. E. Young, J. L. Corden, H. Westphal and P. A. Beachy (1996). "Cyclopia and defective axial patterning in mice lacking Sonic hedgehog gene function." Nature **383**(6599): 407-13.
- Chin, E. R., E. N. Olson, J. A. Richardson, Q. Yang, C. Humphries, J. M. Shelton, H. Wu, W. Zhu, R. Bassel-Duby and R. S. Williams (1998). "A calcineurin-dependent transcriptional pathway controls skeletal muscle fiber type." Genes Dev **12**(16): 2499-509.
- Choi, S. M., H. J. Cho, H. Cho, K. H. Kim, J. B. Kim and H. Park (2008). "Stra13/DEC1 and DEC2 inhibit sterol regulatory element binding protein-1c in a hypoxia-inducible factor-dependent mechanism." Nucleic Acids Res **36**(20): 6372-85.
- Christ, B., H. J. Jacob and M. Jacob (1974). "[Origin of wing musculature. Experimental studies on quail and chick embryos]." Experientia **30**(12): 1446-9.
- Christenson, L. K., T. F. Osborne, J. M. McAllister and J. F. Strauss, 3rd (2001). "Conditional response of the human steroidogenic acute regulatory protein gene promoter to sterol regulatory element binding protein-1a." Endocrinology **142**(1): 28-36.
- Cirillo, L. A., F. R. Lin, I. Cuesta, D. Friedman, M. Jarnik and K. S. Zaret (2002). "Opening of compacted chromatin by early developmental transcription factors HNF3 (FoxA) and GATA-4." Mol Cell **9**(2): 279-89.
- Clark, K. A., A. S. McElhinny, M. C. Beckerle and C. C. Gregorio (2002). "Striated muscle cytoarchitecture: an intricate web of form and function." Annu Rev Cell Dev Biol **18**: 637-706.
- Clegg, C. H., T. A. Linkhart, B. B. Olwin and S. D. Hauschka (1987). "Growth factor control of skeletal muscle differentiation: commitment to terminal differentiation occurs in G1 phase and is repressed by fibroblast growth factor." J Cell Biol **105**(2): 949-56.
- Coleman, M. E., F. DeMayo, K. C. Yin, H. M. Lee, R. Geske, C. Montgomery and R. J. Schwartz (1995). "Myogenic vector expression of insulin-like growth factor I stimulates muscle cell differentiation and myofiber hypertrophy in transgenic mice." J Biol Chem **270**(20): 12109-16.
- Coletta, D. K., B. Balas, A. O. Chavez, M. Baig, M. Abdul-Ghani, S. R. Kashyap, F. Folli, D. Tripathy, L. J. Mandarino, J. E. Cornell, R. A. Defronzo and C. P. Jenkinson (2008). "Effect of acute physiological hyperinsulinemia on gene expression in human skeletal muscle in vivo." Am J Physiol Endocrinol Metab **294**(5): E910-7.
- Coletti, D., V. Moresi, S. Adamo, M. Molinaro and D. Sassoon (2005). "Tumor necrosis factor-alpha gene transfer induces cachexia and inhibits muscle regeneration." Genesis **43**(3): 120-8.
- Commerford, S. R., L. Peng, J. J. Dube and R. M. O'Doherty (2004). "In vivo regulation of SREBP-1c in skeletal muscle: effects of nutritional status, glucose, insulin, and leptin." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **287**(1): R218-27.
- Conboy, I. M. and T. A. Rando (2002). "The regulation of Notch signaling controls satellite cell activation and cell fate determination in postnatal myogenesis." Dev Cell **3**(3): 397-409.
- Cox, D. M., M. Du, M. Marback, E. C. Yang, J. Chan, K. W. Siu and J. C. McDermott (2003). "Phosphorylation motifs regulating the stability and function of myocyte enhancer factor 2A." J Biol Chem **278**(17): 15297-303.
- Cserjesi, P. and E. N. Olson (1991). "Myogenin induces the myocyte-specific enhancer binding factor MEF-2 independently of other muscle-specific gene products." Mol Cell Biol **11**(10): 4854-62.
- Cusi, K., K. Maezono, A. Osman, M. Pendergrass, M. E. Patti, T. Pratipanawat, R. A. DeFronzo, C. R. Kahn and L. J. Mandarino (2000). "Insulin resistance differentially affects the PI 3-kinase- and MAP kinase-mediated signaling in human muscle." J Clin Invest **105**(3): 311-20.

## D.

- d'Amati, G., C. R. di Gioia, C. Giordano and P. Gallo (2000). "Myocyte transdifferentiation: a possible pathogenetic mechanism for arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy." Arch Pathol Lab Med **124**(2): 287-90.
- Dacwag, C. S., M. T. Bedford, S. Sif and A. N. Imbalzano (2009). "Distinct protein arginine methyltransferases promote ATP-dependent chromatin remodeling function at different stages of skeletal muscle differentiation." Mol Cell Biol **29**(7): 1909-21.
- Davis, R. L., P. F. Cheng, A. B. Lassar and H. Weintraub (1990). "The MyoD DNA binding domain contains a recognition code for muscle-specific gene activation." Cell **60**(5): 733-46.



- Davis, R. L. and D. L. Turner (2001). "Vertebrate hairy and Enhancer of split related proteins: transcriptional repressors regulating cellular differentiation and embryonic patterning." *Oncogene* **20**(58): 8342-57.
- Davis, R. L. and H. Weintraub (1992). "Acquisition of myogenic specificity by replacement of three amino acid residues from MyoD into E12." *Science* **256**(5059): 1027-30.
- Dawson, S. R., D. L. Turner, H. Weintraub and S. M. Parkhurst (1995). "Specificity for the hairy/enhancer of split basic helix-loop-helix (bHLH) proteins maps outside the bHLH domain and suggests two separable modes of transcriptional repression." *Mol Cell Biol* **15**(12): 6923-31.
- De Angelis, L., L. Berghella, M. Coletta, L. Lattanzi, M. Zanchi, M. G. Cusella-De Angelis, C. Ponzetto and G. Cossu (1999). "Skeletal myogenic progenitors originating from embryonic dorsal aorta coexpress endothelial and myogenic markers and contribute to postnatal muscle growth and regeneration." *J Cell Biol* **147**(4): 869-78.
- De Falco, G., F. Comes and C. Simone (2006). "pRb: master of differentiation. Coupling irreversible cell cycle withdrawal with induction of muscle-specific transcription." *Oncogene* **25**(38): 5244-9.
- de Ferranti, S. and D. Mozaffarian (2008). "The perfect storm: obesity, adipocyte dysfunction, and metabolic consequences." *Clin Chem* **54**(6): 945-55.
- de la Serna, I. L., K. A. Carlson and A. N. Imbalzano (2001). "Mammalian SWI/SNF complexes promote MyoD-mediated muscle differentiation." *Nat Genet* **27**(2): 187-90.
- Dear, T. N., T. Hainzl, M. Follo, M. Nehls, H. Wilmore, K. Matena and T. Boehm (1997). "Identification of interaction partners for the basic-helix-loop-helix protein E47." *Oncogene* **14**(8): 891-8.
- Delfini, M. C., E. Hirsinger, O. Pourquie and D. Duprez (2000). "Delta 1-activated notch inhibits muscle differentiation without affecting Myf5 and Pax3 expression in chick limb myogenesis." *Development* **127**(23): 5213-24.
- Deng, X., L. M. Cagen, H. G. Wilcox, E. A. Park, R. Raghov and M. B. Elam (2002). "Regulation of the rat SREBP-1c promoter in primary rat hepatocytes." *Biochem Biophys Res Commun* **290**(1): 256-62.
- Deng, X., C. Yellaturu, L. Cagen, H. G. Wilcox, E. A. Park, R. Raghov and M. B. Elam (2007). "Expression of the rat sterol regulatory element-binding protein-1c gene in response to insulin is mediated by increased transactivating capacity of specificity protein 1 (Sp1)." *J Biol Chem* **282**(24): 17517-29.
- Dhar, M. and R. Taneja (2001). "Cross-regulatory interaction between Stra13 and USF results in functional antagonism." *Oncogene* **20**(34): 4750-6.
- Dhawan, J. and T. A. Rando (2005). "Stem cells in postnatal myogenesis: molecular mechanisms of satellite cell quiescence, activation and replenishment." *Trends Cell Biol* **15**(12): 666-73.
- Dietrich, S., F. Abou-Rebyeh, H. Brohmann, F. Bladt, E. Sonnenberg-Riethmacher, T. Yamaai, A. Lumsden, B. Brand-Saberi and C. Birchmeier (1999). "The role of SF/HGF and c-Met in the development of skeletal muscle." *Development* **126**(8): 1621-9.
- Dif, N., V. Euthine, E. Gonnet, M. Laville, H. Vidal and E. Lefai (2006). "Insulin activates human sterol-regulatory-element-binding protein-1c (SREBP-1c) promoter through SRE motifs." *Biochem J* **400**(1): 179-88.
- Dilworth, F. J., K. J. Seaver, A. L. Fishburn, S. L. Htet and S. J. Tapscott (2004). "In vitro transcription system delineates the distinct roles of the coactivators pCAF and p300 during MyoD/E47-dependent transactivation." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(32): 11593-8.
- Diraison, F., E. Dusserre, H. Vidal, M. Sothier and M. Beylot (2002). "Increased hepatic lipogenesis but decreased expression of lipogenic gene in adipose tissue in human obesity." *Am J Physiol Endocrinol Metab* **282**(1): E46-51.
- Dirks, A. J. and C. Leeuwenburgh (2006). "Tumor necrosis factor alpha signaling in skeletal muscle: effects of age and caloric restriction." *J Nutr Biochem* **17**(8): 501-8.
- Dooley, K. A., S. Millinder and T. F. Osborne (1998). "Sterol regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A synthase gene through a direct interaction between sterol regulatory element binding protein and the trimeric CCAAT-binding factor/nuclear factor Y." *J Biol Chem* **273**(3): 1349-56.
- Dresner, A., D. Laurent, M. Marcucci, M. E. Griffin, S. Dufour, G. W. Cline, L. A. Slezak, D. K. Andersen, R. S. Hundal, D. L. Rothman, K. F. Petersen and G. I. Shulman (1999). "Effects of free fatty acids on glucose transport and IRS-1-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity." *J Clin Invest* **103**(2): 253-9.
- Dressel, U., P. J. Bailey, S. C. Wang, M. Downes, R. M. Evans and G. E. Muscat (2001). "A dynamic role for HDAC7 in MEF2-mediated muscle differentiation." *J Biol Chem* **276**(20): 17007-13.
- Ducluzeau, P. H., N. Perretti, M. Laville, F. Andreelli, N. Vega, J. P. Riou and H. Vidal (2001). "Regulation by insulin of gene expression in human skeletal muscle and adipose tissue. Evidence for specific defects in type 2 diabetes." *Diabetes* **50**(5): 1134-42.
- Dulloo, A. G., M. Gubler, J. P. Montani, J. Seydoux and G. Solinas (2004). "Substrate cycling between de novo lipogenesis and lipid oxidation: a thermogenic mechanism against skeletal muscle lipotoxicity and glucolipotoxicity." *Int J Obes Relat Metab Disord* **28 Suppl 4**: S29-37.

- Duncan, E. A., M. S. Brown, J. L. Goldstein and J. Sakai (1997). "Cleavage site for sterol-regulated protease localized to a leu-Ser bond in the luminal loop of sterol regulatory element-binding protein-2." J Biol Chem **272**(19): 12778-85.
- Duncan, E. A., U. P. Dave, J. Sakai, J. L. Goldstein and M. S. Brown (1998). "Second-site cleavage in sterol regulatory element-binding protein occurs at transmembrane junction as determined by cysteine panning." J Biol Chem **273**(28): 17801-9.

## E.

- Eberle, D., B. Hegarty, P. Bossard, P. Ferre and F. Foulle (2004). "SREBP transcription factors: master regulators of lipid homeostasis." Biochimie **86**(11): 839-48.
- Eckner, R., T. P. Yao, E. Oldread and D. M. Livingston (1996). "Interaction and functional collaboration of p300/CBP and bHLH proteins in muscle and B-cell differentiation." Genes Dev **10**(19): 2478-90.
- Edmondson, D. G., T. C. Cheng, P. Cserjesi, T. Chakraborty and E. N. Olson (1992). "Analysis of the myogenin promoter reveals an indirect pathway for positive autoregulation mediated by the muscle-specific enhancer factor MEF-2." Mol Cell Biol **12**(9): 3665-77.
- Edmondson, D. G. and E. N. Olson (1989). "A gene with homology to the myc similarity region of MyoD1 is expressed during myogenesis and is sufficient to activate the muscle differentiation program." Genes Dev **3**(5): 628-40.
- Edmondson, D. G. and E. N. Olson (1993). "Helix-loop-helix proteins as regulators of muscle-specific transcription." J Biol Chem **268**(2): 755-8.
- Edwards, P. A., D. Tabor, H. R. Kast and A. Venkateswaran (2000). "Regulation of gene expression by SREBP and SCAP." Biochim Biophys Acta **1529**(1-3): 103-13.
- Ehata, S., A. Hanyu, M. Hayashi, H. Aburatani, Y. Kato, M. Fujime, M. Saitoh, K. Miyazawa, T. Imamura and K. Miyazono (2007). "Transforming growth factor-beta promotes survival of mammary carcinoma cells through induction of antiapoptotic transcription factor DEC1." Cancer Res **67**(20): 9694-703.
- Ekmark, M., E. Gronevik, P. Schjerling and K. Gundersen (2003). "Myogenin induces higher oxidative capacity in pre-existing mouse muscle fibres after somatic DNA transfer." J Physiol **548**(Pt 1): 259-69.
- Ekmark, M., Z. A. Rana, G. Stewart, D. G. Hardie and K. Gundersen (2007). "De-phosphorylation of MyoD is linking nerve-evoked activity to fast myosin heavy chain expression in rodent adult skeletal muscle." J Physiol **584**(Pt 2): 637-50.
- Ellenberger, T., D. Fass, M. Arnaud and S. C. Harrison (1994). "Crystal structure of transcription factor E47: E-box recognition by a basic region helix-loop-helix dimer." Genes Dev **8**(8): 970-80.
- Endo, M., T. Masaki, M. Seike and H. Yoshimatsu (2007). "TNF-alpha induces hepatic steatosis in mice by enhancing gene expression of sterol regulatory element binding protein-1c (SREBP-1c)." Exp Biol Med (Maywood) **232**(5): 614-21.
- Engelking, L. J., H. Kuriyama, R. E. Hammer, J. D. Horton, M. S. Brown, J. L. Goldstein and G. Liang (2004). "Overexpression of Insig-1 in the livers of transgenic mice inhibits SREBP processing and reduces insulin-stimulated lipogenesis." J Clin Invest **113**(8): 1168-75.
- Ericsson, J., A. Usheva and P. A. Edwards (1999). "YY1 is a negative regulator of transcription of three sterol regulatory element-binding protein-responsive genes." J Biol Chem **274**(20): 14508-13.
- Espenshade, P. J., W. P. Li and D. Yabe (2002). "Sterols block binding of COPII proteins to SCAP, thereby controlling SCAP sorting in ER." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(18): 11694-9.

## F.

- Faucher, M., C. Guillot, T. Marqueste, N. Kipson, M. H. Mayet-Sornay, D. Desplanches, Y. Jammes and M. Badier (2005). "Matched adaptations of electrophysiological, physiological, and histological properties of skeletal muscles in response to chronic hypoxia." Pflugers Arch **450**(1): 45-52.
- Favier, F. B., H. Benoit and D. Freyssenet (2008). "Cellular and molecular events controlling skeletal muscle mass in response to altered use." Pflugers Arch **456**(3): 587-600.
- Feldman, J. L. and F. E. Stockdale (1992). "Temporal appearance of satellite cells during myogenesis." Dev Biol **153**(2): 217-26.
- Feramisco, J. D., J. L. Goldstein and M. S. Brown (2004). "Membrane topology of human insig-1, a protein regulator of lipid synthesis." J Biol Chem **279**(9): 8487-96.
- Feramisco, J. D., A. Radhakrishnan, Y. Ikeda, J. Reitz, M. S. Brown and J. L. Goldstein (2005). "Intramembrane aspartic acid in SCAP protein governs cholesterol-induced conformational change." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(9): 3242-7.

- Ferrari, G., G. Cusella-De Angelis, M. Coletta, E. Paolucci, A. Stornaiuolo, G. Cossu and F. Mavilio (1998). "Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors." *Science* **279**(5356): 1528-30.
- Ferre-D'Amare, A. R., G. C. Prendergast, E. B. Ziff and S. K. Burley (1993). "Recognition by Max of its cognate DNA through a dimeric b/HLH/Z domain." *Nature* **363**(6424): 38-45.
- Ferre, P. and F. Foufelle (2007). "SREBP-1c transcription factor and lipid homeostasis: clinical perspective." *Horm Res* **68**(2): 72-82.
- Fisher, A. L., S. Ohsako and M. Caudy (1996). "The WRPW motif of the hairy-related basic helix-loop-helix repressor proteins acts as a 4-amino-acid transcription repression and protein-protein interaction domain." *Mol Cell Biol* **16**(6): 2670-7.
- Folli, F., M. J. Saad, J. M. Backer and C. R. Kahn (1993). "Regulation of phosphatidylinositol 3-kinase activity in liver and muscle of animal models of insulin-resistant and insulin-deficient diabetes mellitus." *J Clin Invest* **92**(4): 1787-94.
- Foretz, M., C. Guichard, P. Ferre and F. Foufelle (1999a). "Sterol regulatory element binding protein-1c is a major mediator of insulin action on the hepatic expression of glucokinase and lipogenesis-related genes." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(22): 12737-42.
- Foretz, M., C. Pacot, I. Dugail, P. Lemarchand, C. Guichard, X. Le Liepvre, C. Berthelie-Lubrano, B. Spiegelman, J. B. Kim, P. Ferre and F. Foufelle (1999b). "ADD1/SREBP-1c is required in the activation of hepatic lipogenic gene expression by glucose." *Mol Cell Biol* **19**(5): 3760-8.
- Foufelle, F., J. Girard and P. Ferre (1998). "Glucose regulation of gene expression." *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* **1**(4): 323-8.
- Francis-West, P. H., L. Antoni and K. Anakwe (2003). "Regulation of myogenic differentiation in the developing limb bud." *J Anat* **202**(1): 69-81.
- Franklin, D. S. and Y. Xiong (1996). "Induction of p18INK4c and its predominant association with CDK4 and CDK6 during myogenic differentiation." *Mol Biol Cell* **7**(10): 1587-99.
- Franz, T., R. Kothary, M. A. Surani, Z. Halata and M. Grim (1993). "The Splotch mutation interferes with muscle development in the limbs." *Anat Embryol (Berl)* **187**(2): 153-60.
- Friday, B. B., P. O. Mitchell, K. M. Kegley and G. K. Pavlath (2003). "Calcineurin initiates skeletal muscle differentiation by activating MEF2 and MyoD." *Differentiation* **71**(3): 217-27.
- Friday, B. B. and G. K. Pavlath (2001). "A calcineurin- and NFAT-dependent pathway regulates Myf5 gene expression in skeletal muscle reserve cells." *J Cell Sci* **114**(Pt 2): 303-10.
- Frojdo, S., H. Vidal and L. Pirola (2009). "Alterations of insulin signaling in type 2 diabetes: a review of the current evidence from humans." *Biochim Biophys Acta* **1792**(2): 83-92.
- Frost, R. A. and C. H. Lang (2007). "Protein kinase B/Akt: a nexus of growth factor and cytokine signaling in determining muscle mass." *J Appl Physiol* **103**(1): 378-87.
- Fujimoto, K., H. Hamaguchi, T. Hashiba, T. Nakamura, T. Kawamoto, F. Sato, M. Noshiro, U. K. Bhawal, K. Suardita and Y. Kato (2007). "Transcriptional repression by the basic helix-loop-helix protein Dec2: multiple mechanisms through E-box elements." *Int J Mol Med* **19**(6): 925-32.
- Fujimoto, K., M. Shen, M. Noshiro, K. Matsubara, S. Shingu, K. Honda, E. Yoshida, K. Suardita, Y. Matsuda and Y. Kato (2001). "Molecular cloning and characterization of DEC2, a new member of basic helix-loop-helix proteins." *Biochem Biophys Res Commun* **280**(1): 164-71.
- Fulco, M., R. L. Schiltz, S. Iezzi, M. T. King, P. Zhao, Y. Kashiwaya, E. Hoffman, R. L. Veech and V. Sartorelli (2003). "Sir2 regulates skeletal muscle differentiation as a potential sensor of the redox state." *Mol Cell* **12**(1): 51-62.
- Funk, W. D. and W. E. Wright (1992). "Cyclic amplification and selection of targets for multicomponent complexes: myogenin interacts with factors recognizing binding sites for basic helix-loop-helix, nuclear factor 1, myocyte-specific enhancer-binding factor 2, and COMP1 factor." *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(20): 9484-8.
- Furuta, E., S. K. Pai, R. Zhan, S. Bandyopadhyay, M. Watabe, Y. Y. Mo, S. Hirota, S. Hosobe, T. Tsukada, K. Miura, S. Kamada, K. Saito, M. Iizumi, W. Liu, J. Ericsson and K. Watabe (2008). "Fatty acid synthase gene is up-regulated by hypoxia via activation of Akt and sterol regulatory element binding protein-1." *Cancer Res* **68**(4): 1003-11.

## G.

- Garriga-Canut, M., A. Roopra and N. J. Buckley (2001). "The basic helix-loop-helix protein, sharp-1, represses transcription by a histone deacetylase-dependent and histone deacetylase-independent mechanism." *J Biol Chem* **276**(18): 14821-8.
- Gaster, M., P. Staehr, H. Beck-Nielsen, H. D. Schroder and A. Handberg (2001). "GLUT4 is reduced in slow muscle fibers of type 2 diabetic patients: is insulin resistance in type 2 diabetes a slow, type 1 fiber disease?" *Diabetes* **50**(6): 1324-9.

- Gayraud-Morel, B., F. Chretien, P. Flamant, D. Gomes, P. S. Zammit and S. Tajbakhsh (2007). "A role for the myogenic determination gene *Myf5* in adult regenerative myogenesis." *Dev Biol* **312**(1): 13-28.
- Gerber, A. N., T. R. Klesert, D. A. Bergstrom and S. J. Tapscott (1997). "Two domains of *MyoD* mediate transcriptional activation of genes in repressive chromatin: a mechanism for lineage determination in myogenesis." *Genes Dev* **11**(4): 436-50.
- Ghosh, N., N. Patel, K. Jiang, J. E. Watson, J. Cheng, C. E. Chalfant and D. R. Cooper (2007). "Ceramide-activated protein phosphatase involvement in insulin resistance via Akt, serine/arginine-rich protein 40, and ribonucleic acid splicing in L6 skeletal muscle cells." *Endocrinology* **148**(3): 1359-66.
- Giatromanolaki, A., M. I. Koukourakis, E. Sivridis, H. Turley, C. C. Wykoff, K. C. Gatter and A. L. Harris (2003). "DEC1 (STRA13) protein expression relates to hypoxia-inducible factor 1- $\alpha$  and carbonic anhydrase-9 overexpression in non-small cell lung cancer." *J Pathol* **200**(2): 222-8.
- Gibot, L., J. Follet, J. P. Metges, P. Auvray, B. Simon, L. Corcos and C. Le Jossic-Corcos (2009). "Human caspase-7 is positively controlled by SREBP-1 and SREBP-2." *Biochem J*.
- Girard, J., P. Ferre and F. Fougere (1997). "Mechanisms by which carbohydrates regulate expression of genes for glycolytic and lipogenic enzymes." *Annu Rev Nutr* **17**: 325-52.
- Goldhamer, D. J., B. P. Brunk, A. Faerman, A. King, M. Shani and C. P. Emerson, Jr. (1995). "Embryonic activation of the *myoD* gene is regulated by a highly conserved distal control element." *Development* **121**(3): 637-49.
- Goldstein, J. L., R. A. DeBose-Boyd and M. S. Brown (2006). "Protein sensors for membrane sterols." *Cell* **124**(1): 35-46.
- Gomes, M. D., S. H. Lecker, R. T. Jagoe, A. Navon and A. L. Goldberg (2001). "Atrogin-1, a muscle-specific Fox box protein highly expressed during muscle atrophy." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(25): 14440-5.
- Goodpaster, B. H., J. He, S. Watkins and D. E. Kelley (2001). "Skeletal muscle lipid content and insulin resistance: evidence for a paradox in endurance-trained athletes." *J Clin Endocrinol Metab* **86**(12): 5755-61.
- Gosmain, Y., N. Dif, V. Berbe, E. Loizon, J. Rieusset, H. Vidal and E. Lefai (2005). "Regulation of SREBP-1 expression and transcriptional action on HKII and FAS genes during fasting and refeeding in rat tissues." *J Lipid Res* **46**(4): 697-705.
- Gosmain, Y., E. Lefai, S. Ryser, M. Roques and H. Vidal (2004). "Sterol regulatory element-binding protein-1 mediates the effect of insulin on hexokinase II gene expression in human muscle cells." *Diabetes* **53**(2): 321-9.
- Gossett, L. A., D. J. Kelvin, E. A. Sternberg and E. N. Olson (1989). "A new myocyte-specific enhancer-binding factor that recognizes a conserved element associated with multiple muscle-specific genes." *Mol Cell Biol* **9**(11): 5022-33.
- Grandori, C., S. M. Cowley, L. P. James and R. N. Eisenman (2000). "The Myc/Max/Mad network and the transcriptional control of cell behavior." *Annu Rev Cell Dev Biol* **16**: 653-99.
- Granner, D. and S. Pilakis (1990). "The genes of hepatic glucose metabolism." *J Biol Chem* **265**(18): 10173-6.
- Grechez-Cassiau, A., S. Panda, S. Lacoche, M. Teboul, S. Azmi, V. Laudet, J. B. Hogenesch, R. Taneja and F. Delaunay (2004). "The transcriptional repressor STRA13 regulates a subset of peripheral circadian outputs." *J Biol Chem* **279**(2): 1141-50.
- Griffin, M. E., M. J. Marcucci, G. W. Cline, K. Bell, N. Barucci, D. Lee, L. J. Goodyear, E. W. Kraegen, M. F. White and G. I. Shulman (1999). "Free fatty acid-induced insulin resistance is associated with activation of protein kinase C  $\theta$  and alterations in the insulin signaling cascade." *Diabetes* **48**(6): 1270-4.
- Griffin, M. J., R. H. Wong, N. Pandya and H. S. Sul (2007). "Direct interaction between USF and SREBP-1c mediates synergistic activation of the fatty-acid synthase promoter." *J Biol Chem* **282**(8): 5453-67.
- Grifone, R., C. Laclef, F. Spitz, S. Lopez, J. Demignon, J. E. Guidotti, K. Kawakami, P. X. Xu, R. Kelly, B. J. Petrof, D. Daegelen, J. P. Concordet and P. Maire (2004). "Six1 and Eya1 expression can reprogram adult muscle from the slow-twitch phenotype into the fast-twitch phenotype." *Mol Cell Biol* **24**(14): 6253-67.
- Grimaldi, P. A., L. Teboul, H. Inadera, D. Gaillard and E. Z. Amri (1997). "Trans-differentiation of myoblasts to adipoblasts: triggering effects of fatty acids and thiazolidinediones." *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **57**(1): 71-5.
- Gros, J., M. Manceau, V. Thome and C. Marcelle (2005). "A common somitic origin for embryonic muscle progenitors and satellite cells." *Nature* **435**(7044): 954-8.
- Gu, W., J. W. Schneider, G. Condorelli, S. Kaushal, V. Mahdavi and B. Nadal-Ginard (1993). "Interaction of myogenic factors and the retinoblastoma protein mediates muscle cell commitment and differentiation." *Cell* **72**(3): 309-24.
- Guilherme, A., J. V. Virbasius, V. Puri and M. P. Czech (2008). "Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes." *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**(5): 367-77.

- Guillaumond, F., S. Lacoche, S. Dulong, A. Grechez-Cassiau, E. Filipinski, X. M. Li, F. Levi, E. Berra, F. Delaunay and M. Teboul (2008). "Altered Stra13 and Dec2 circadian gene expression in hypoxic cells." Biochem Biophys Res Commun **369**(4): 1184-9.
- Guillemain, G., G. Da Silva Xavier, I. Rafiq, A. Leturque and G. A. Rutter (2004). "Importin beta1 mediates the glucose-stimulated nuclear import of pancreatic and duodenal homeobox-1 in pancreatic islet beta-cells (MIN6)." Biochem J **378**(Pt 1): 219-27.
- Guillet-Deniau, I., V. Mieulet, S. Le Lay, Y. Achouri, D. Carre, J. Girard, F. Fougelle and P. Ferre (2002). "Sterol regulatory element binding protein-1c expression and action in rat muscles: insulin-like effects on the control of glycolytic and lipogenic enzymes and UCP3 gene expression." Diabetes **51**(6): 1722-8.
- Guillet-Deniau, I., A. L. Pichard, A. Kone, C. Esnous, M. Nieruchalski, J. Girard and C. Prip-Buus (2004). "Glucose induces de novo lipogenesis in rat muscle satellite cells through a sterol-regulatory-element-binding-protein-1c-dependent pathway." J Cell Sci **117**(Pt 10): 1937-44.
- Gulbagci, N. T., L. Li, B. Ling, S. Gopinadhan, M. Walsh, M. Rossner, K. A. Nave and R. Taneja (2009). "SHARP1/DEC2 inhibits adipogenic differentiation by regulating the activity of C/EBP." EMBO Rep **10**(1): 79-86.
- Gundersen, K. and J. P. Merlie (1994). "Id-1 as a possible transcriptional mediator of muscle disuse atrophy." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(9): 3647-51.
- Guo, K. and K. Walsh (1997). "Inhibition of myogenesis by multiple cyclin-Cdk complexes. Coordinate regulation of myogenesis and cell cycle activity at the level of E2F." J Biol Chem **272**(2): 791-7.
- Guo, K., J. Wang, V. Andres, R. C. Smith and K. Walsh (1995). "MyoD-induced expression of p21 inhibits cyclin-dependent kinase activity upon myocyte terminal differentiation." Mol Cell Biol **15**(7): 3823-9.

## H.

- Hadchouel, J., S. Tajbakhsh, M. Primig, T. H. Chang, P. Daubas, D. Rocancourt and M. Buckingham (2000). "Modular long-range regulation of Myf5 reveals unexpected heterogeneity between skeletal muscles in the mouse embryo." Development **127**(20): 4455-67.
- Haddad, F. and G. R. Adams (2006). "Aging-sensitive cellular and molecular mechanisms associated with skeletal muscle hypertrophy." J Appl Physiol **100**(4): 1188-203.
- Haddad, F., R. R. Roy, H. Zhong, V. R. Edgerton and K. M. Baldwin (2003). "Atrophy responses to muscle inactivity. II. Molecular markers of protein deficits." J Appl Physiol **95**(2): 791-802.
- Halevy, O., B. G. Novitsch, D. B. Spicer, S. X. Skapek, J. Rhee, G. J. Hannon, D. Beach and A. B. Lassar (1995). "Correlation of terminal cell cycle arrest of skeletal muscle with induction of p21 by MyoD." Science **267**(5200): 1018-21.
- Halvatsiotis, P., K. R. Short, M. Bigelow and K. S. Nair (2002). "Synthesis rate of muscle proteins, muscle functions, and amino acid kinetics in type 2 diabetes." Diabetes **51**(8): 2395-404.
- Hamaguchi, H., K. Fujimoto, T. Kawamoto, M. Noshiro, K. Maemura, N. Takeda, R. Nagai, M. Furukawa, S. Honma, K. Honma, H. Kurihara and Y. Kato (2004). "Expression of the gene for Dec2, a basic helix-loop-helix transcription factor, is regulated by a molecular clock system." Biochem J **382**(Pt 1): 43-50.
- Hamamori, Y., H. Y. Wu, V. Sartorelli and L. Kedes (1997). "The basic domain of myogenic basic helix-loop-helix (bHLH) proteins is the novel target for direct inhibition by another bHLH protein, Twist." Mol Cell Biol **17**(11): 6563-73.
- Han, J., Y. Jiang, Z. Li, V. V. Kravchenko and R. J. Ulevitch (1997). "Activation of the transcription factor MEF2C by the MAP kinase p38 in inflammation." Nature **386**(6622): 296-9.
- Hannah, V. C., J. Ou, A. Luong, J. L. Goldstein and M. S. Brown (2001). "Unsaturated fatty acids down-regulate srebp isoforms 1a and 1c by two mechanisms in HEK-293 cells." J Biol Chem **276**(6): 4365-72.
- Hansen, L., M. Gaster, E. J. Oakeley, K. Brusgaard, E. M. Damsgaard Nielsen, H. Beck-Nielsen, O. Pedersen and B. A. Hemmings (2004). "Expression profiling of insulin action in human myotubes: induction of inflammatory and pro-angiogenic pathways in relationship with glycogen synthesis and type 2 diabetes." Biochem Biophys Res Commun **323**(2): 685-95.
- Hardy, S., Y. Kong and S. F. Konieczny (1993). "Fibroblast growth factor inhibits MRF4 activity independently of the phosphorylation status of a conserved threonine residue within the DNA-binding domain." Mol Cell Biol **13**(10): 5943-56.
- Harridge, S. D. (2007). "Plasticity of human skeletal muscle: gene expression to in vivo function." Exp Physiol **92**(5): 783-97.
- Hasty, A. H., H. Shimano, N. Yahagi, M. Amemiya-Kudo, S. Perrey, T. Yoshikawa, J. Osuga, H. Okazaki, Y. Tamura, Y. Iizuka, F. Shionoiri, K. Ohashi, K. Harada, T. Gotoda, R. Nagai, S. Ishibashi and N. Yamada (2000). "Sterol regulatory element-binding protein-1 is regulated by glucose at the transcriptional level." J Biol Chem **275**(40): 31069-77.

- Hasty, P., A. Bradley, J. H. Morris, D. G. Edmondson, J. M. Venuti, E. N. Olson and W. H. Klein (1993). "Muscle deficiency and neonatal death in mice with a targeted mutation in the myogenin gene." Nature **364**(6437): 501-6.
- Hawke, T. J. and D. J. Garry (2001). "Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology." J Appl Physiol **91**(2): 534-51.
- Hespeel, P., B. Op't Eijnde, M. Van Leemputte, B. Urso, P. L. Greenhaff, V. Labarque, S. Dymarkowski, P. Van Hecke and E. A. Richter (2001). "Oral creatine supplementation facilitates the rehabilitation of disuse atrophy and alters the expression of muscle myogenic factors in humans." J Physiol **536**(Pt 2): 625-33.
- Hickey, M. S., J. O. Carey, J. L. Azevedo, J. A. Houmard, W. J. Pories, R. G. Israel and G. L. Dohm (1995). "Skeletal muscle fiber composition is related to adiposity and in vitro glucose transport rate in humans." Am J Physiol **268**(3 Pt 1): E453-7.
- Higgins, M. E. and Y. A. Ioannou (2001). "Apoptosis-induced release of mature sterol regulatory element-binding proteins activates sterol-responsive genes." J Lipid Res **42**(12): 1939-46.
- Hirano, S., K. Yamada, H. Kawata, Z. Shou, T. Mizutani, Y. Shigematsu, M. Mayumi and K. Miyamoto (2004). "The rat enhancer of split- and hairy-related protein-2 gene: hepatic expression, genomic structure, and promoter analysis." Arch Biochem Biophys **422**(1): 81-90.
- Holst, D., S. Luquet, K. Kristiansen and P. A. Grimaldi (2003). "Roles of peroxisome proliferator-activated receptors delta and gamma in myoblast transdifferentiation." Exp Cell Res **288**(1): 168-76.
- Honma, S., T. Kawamoto, Y. Takagi, K. Fujimoto, F. Sato, M. Noshiro, Y. Kato and K. Honma (2002). "Dec1 and Dec2 are regulators of the mammalian molecular clock." Nature **419**(6909): 841-4.
- Hoppeler, H. (1986). "Exercise-induced ultrastructural changes in skeletal muscle." Int J Sports Med **7**(4): 187-204.
- Hoppeler, H., H. Howald, K. Conley, S. L. Lindstedt, H. Claassen, P. Vock and E. R. Weibel (1985). "Endurance training in humans: aerobic capacity and structure of skeletal muscle." J Appl Physiol **59**(2): 320-7.
- Horton, J. D. (2002). "Sterol regulatory element-binding proteins: transcriptional activators of lipid synthesis." Biochem Soc Trans **30**(Pt 6): 1091-5.
- Horton, J. D., Y. Bashmakov, I. Shimomura and H. Shimano (1998). "Regulation of sterol regulatory element binding proteins in livers of fasted and re-fed mice." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(11): 5987-92.
- Horton, J. D., J. L. Goldstein and M. S. Brown (2002a). "SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver." J Clin Invest **109**(9): 1125-31.
- Horton, J. D., J. L. Goldstein and M. S. Brown (2002b). "SREBPs: transcriptional mediators of lipid homeostasis." Cold Spring Harb Symp Quant Biol **67**: 491-8.
- Horton, J. D., N. A. Shah, J. A. Warrington, N. N. Anderson, S. W. Park, M. S. Brown and J. L. Goldstein (2003a). "Combined analysis of oligonucleotide microarray data from transgenic and knockout mice identifies direct SREBP target genes." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(21): 12027-32.
- Horton, J. D., I. Shimomura, S. Ikemoto, Y. Bashmakov and R. E. Hammer (2003b). "Overexpression of sterol regulatory element-binding protein-1a in mouse adipose tissue produces adipocyte hypertrophy, increased fatty acid secretion, and fatty liver." J Biol Chem **278**(38): 36652-60.
- Horwitz, M. (1996). "Hypermethylated myoblasts specifically deficient in MyoD autoactivation as a consequence of instability of MyoD." Exp Cell Res **226**(1): 170-82.
- Hotamisligil, G. S. (1999). "The role of TNFalpha and TNF receptors in obesity and insulin resistance." J Intern Med **245**(6): 621-5.
- Houzelstein, D., G. Auda-Boucher, Y. Cheraud, T. Rouaud, I. Blanc, S. Tajbakhsh, M. E. Buckingham, J. Fontaine-Perus and B. Robert (1999). "The homeobox gene Msx1 is expressed in a subset of somites, and in muscle progenitor cells migrating into the forelimb." Development **126**(12): 2689-701.
- Howald, H. and H. Hoppeler (2003). "Performing at extreme altitude: muscle cellular and subcellular adaptations." Eur J Appl Physiol **90**(3-4): 360-4.
- Hu, E., P. Tontonoz and B. M. Spiegelman (1995). "Transdifferentiation of myoblasts by the adipogenic transcription factors PPAR gamma and C/EBP alpha." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(21): 9856-60.
- Hu, J. S., E. N. Olson and R. E. Kingston (1992). "HEB, a helix-loop-helix protein related to E2A and ITF2 that can modulate the DNA-binding ability of myogenic regulatory factors." Mol Cell Biol **12**(3): 1031-42.
- Hua, X., A. Nothurfft, J. L. Goldstein and M. S. Brown (1996a). "Sterol resistance in CHO cells traced to point mutation in SREBP cleavage-activating protein." Cell **87**(3): 415-26.
- Hua, X., J. Sakai, M. S. Brown and J. L. Goldstein (1996b). "Regulated cleavage of sterol regulatory element binding proteins requires sequences on both sides of the endoplasmic reticulum membrane." J Biol Chem **271**(17): 10379-84.
- Hua, X., J. Sakai, Y. K. Ho, J. L. Goldstein and M. S. Brown (1995a). "Hairpin orientation of sterol regulatory element-binding protein-2 in cell membranes as determined by protease protection." J Biol Chem **270**(49): 29422-7.

- Hua, X., J. Wu, J. L. Goldstein, M. S. Brown and H. H. Hobbs (1995b). "Structure of the human gene encoding sterol regulatory element binding protein-1 (SREBF1) and localization of SREBF1 and SREBF2 to chromosomes 17p11.2 and 22q13." Genomics **25**(3): 667-73.
- Hua, X., C. Yokoyama, J. Wu, M. R. Briggs, M. S. Brown, J. L. Goldstein and X. Wang (1993). "SREBP-2, a second basic-helix-loop-helix-leucine zipper protein that stimulates transcription by binding to a sterol regulatory element." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(24): 11603-7.
- Huang, J., T. K. Blackwell, L. Kedes and H. Weintraub (1996). "Differences between MyoD DNA binding and activation site requirements revealed by functional random sequence selection." Mol Cell Biol **16**(7): 3893-900.
- Hughes, A. L., B. L. Todd and P. J. Espenshade (2005). "SREBP pathway responds to sterols and functions as an oxygen sensor in fission yeast." Cell **120**(6): 831-42.
- Hughes, M., N. Dobric, I. C. Scott, L. Su, M. Starovic, B. St-Pierre, S. E. Egan, J. C. Kingdom and J. C. Cross (2004). "The Hand1, Stra13 and Gcm1 transcription factors override FGF signaling to promote terminal differentiation of trophoblast stem cells." Dev Biol **271**(1): 26-37.
- Hughes, S. M., M. M. Chi, O. H. Lowry and K. Gundersen (1999). "Myogenin induces a shift of enzyme activity from glycolytic to oxidative metabolism in muscles of transgenic mice." J Cell Biol **145**(3): 633-42.
- Hughes, S. M., K. Koishi, M. Rudnicki and A. M. Maggs (1997). "MyoD protein is differentially accumulated in fast and slow skeletal muscle fibres and required for normal fibre type balance in rodents." Mech Dev **61**(1-2): 151-63.
- Hughes, S. M., J. M. Taylor, S. J. Tapscott, C. M. Gurley, W. J. Carter and C. A. Peterson (1993). "Selective accumulation of MyoD and myogenin mRNAs in fast and slow adult skeletal muscle is controlled by innervation and hormones." Development **118**(4): 1137-47.
- Hunter, R. B., E. Stevenson, A. Koncarevic, H. Mitchell-Felton, D. A. Essig and S. C. Kandarian (2002). "Activation of an alternative NF-kappaB pathway in skeletal muscle during disuse atrophy." Faseb J **16**(6): 529-38.
- Hyatt, J. P., R. R. Roy, K. M. Baldwin and V. R. Edgerton (2003). "Nerve activity-independent regulation of skeletal muscle atrophy: role of MyoD and myogenin in satellite cells and myonuclei." Am J Physiol Cell Physiol **285**(5): C1161-73.

## I.

- Iizuka, K. and Y. Horikawa (2008). "Regulation of lipogenesis via BHLHB2/DEC1 and ChREBP feedback looping." Biochem Biophys Res Commun **374**(1): 95-100.
- Ikeda, S., H. Miyazaki, T. Nakatani, Y. Kai, Y. Kamei, S. Miura, N. Tsuboyama-Kasaoka and O. Ezaki (2002). "Up-regulation of SREBP-1c and lipogenic genes in skeletal muscles after exercise training." Biochem Biophys Res Commun **296**(2): 395-400.
- Ikeda, Y., J. Yamamoto, M. Okamura, T. Fujino, S. Takahashi, K. Takeuchi, T. F. Osborne, T. T. Yamamoto, S. Ito and J. Sakai (2001). "Transcriptional regulation of the murine acetyl-CoA synthetase 1 gene through multiple clustered binding sites for sterol regulatory element-binding proteins and a single neighboring site for Sp1." J Biol Chem **276**(36): 34259-69.
- Inadera, H., S. Nagai, H. Y. Dong and K. Matsushima (2002). "Molecular analysis of lipid-depleting factor in a colon-26-inoculated cancer cachexia model." Int J Cancer **101**(1): 37-45.
- Ip, M. S., B. Lam, M. M. Ng, W. K. Lam, K. W. Tsang and K. S. Lam (2002). "Obstructive sleep apnea is independently associated with insulin resistance." Am J Respir Crit Care Med **165**(5): 670-6.
- Ishido, M., K. Kami and M. Masuhara (2004a). "In vivo expression patterns of MyoD, p21, and Rb proteins in myonuclei and satellite cells of denervated rat skeletal muscle." Am J Physiol Cell Physiol **287**(2): C484-93.
- Ishido, M., K. Kami and M. Masuhara (2004b). "Localization of MyoD, myogenin and cell cycle regulatory factors in hypertrophying rat skeletal muscles." Acta Physiol Scand **180**(3): 281-9.
- Itani, S. I., N. B. Ruderman, F. Schmedier and G. Boden (2002). "Lipid-induced insulin resistance in human muscle is associated with changes in diacylglycerol, protein kinase C, and IkappaB-alpha." Diabetes **51**(7): 2005-11.
- Itoh, K., M. Itoh, A. Ishihara, C. Hirofuji and H. Hayashi (1995). "Influence of 12 weeks of hypobaric hypoxia on fibre type composition of the rat soleus muscle." Acta Physiol Scand **154**(3): 417-8.
- Itoh, K., T. Moritani, K. Ishida, C. Hirofuji, S. Taguchi and M. Itoh (1990). "Hypoxia-induced fibre type transformation in rat hindlimb muscles. Histochemical and electro-mechanical changes." Eur J Appl Physiol Occup Physiol **60**(5): 331-6.
- Ivanova, A., S. Y. Liao, M. I. Lerman, S. Ivanov and E. J. Stanbridge (2005a). "STRA13 expression and subcellular localisation in normal and tumour tissues: implications for use as a diagnostic and differentiation marker." J Med Genet **42**(7): 565-76.

- Ivanova, A. V., S. V. Ivanov, A. Danilkovitch-Miagkova and M. I. Lerman (2001). "Regulation of STRA13 by the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein, hypoxia, and the UBC9/ubiquitin proteasome degradation pathway." *J Biol Chem* **276**(18): 15306-15.
- Ivanova, A. V., S. V. Ivanov and M. L. Lerman (2005b). "Association, mutual stabilization, and transcriptional activity of the STRA13 and MSP58 proteins." *Cell Mol Life Sci* **62**(4): 471-84.
- Ivanova, A. V., S. V. Ivanov, X. Zhang, V. N. Ivanov, O. A. Timofeeva and M. I. Lerman (2004). "STRA13 interacts with STAT3 and modulates transcription of STAT3-dependent targets." *J Mol Biol* **340**(4): 641-53.
- Iwata, T., T. Kawamoto, E. Sasabe, K. Miyazaki, K. Fujimoto, M. Noshiro, H. Kurihara and Y. Kato (2006). "Effects of overexpression of basic helix-loop-helix transcription factor Dec1 on osteogenic and adipogenic differentiation of mesenchymal stem cells." *Eur J Cell Biol* **85**(5): 423-31.

## J.

- Jackson, S. M., J. Ericsson, R. Mantovani and P. A. Edwards (1998). "Synergistic activation of transcription by nuclear factor Y and sterol regulatory element binding protein." *J Lipid Res* **39**(4): 767-76.
- Jagoe, R. T. and M. P. Engelen (2003). "Muscle wasting and changes in muscle protein metabolism in chronic obstructive pulmonary disease." *Eur Respir J Suppl* **46**: 52s-63s.
- Jagoe, R. T., S. H. Lecker, M. Gomes and A. L. Goldberg (2002). "Patterns of gene expression in atrophying skeletal muscles: response to food deprivation." *Faseb J* **16**(13): 1697-712.
- Janatpour, M. J., M. F. Utset, J. C. Cross, J. Rossant, J. Dong, M. A. Israel and S. J. Fisher (1999). "A repertoire of differentially expressed transcription factors that offers insight into mechanisms of human cytotrophoblast differentiation." *Dev Genet* **25**(2): 146-57.
- Jen, Y., H. Weintraub and R. Benezra (1992). "Overexpression of Id protein inhibits the muscle differentiation program: in vivo association of Id with E2A proteins." *Genes Dev* **6**(8): 1466-79.
- Johnson, R. L., E. Laufer, R. D. Riddle and C. Tabin (1994a). "Ectopic expression of Sonic hedgehog alters dorsal-ventral patterning of somites." *Cell* **79**(7): 1165-73.
- Johnson, R. L., R. D. Riddle, E. Laufer and C. Tabin (1994b). "Sonic hedgehog: a key mediator of anterior-posterior patterning of the limb and dorso-ventral patterning of axial embryonic structures." *Biochem Soc Trans* **22**(3): 569-74.
- Johnson, S. E. and R. E. Allen (1995). "Activation of skeletal muscle satellite cells and the role of fibroblast growth factor receptors." *Exp Cell Res* **219**(2): 449-53.
- Jones, S. (2004). "An overview of the basic helix-loop-helix proteins." *Genome Biol* **5**(6): 226.
- Joseph, S. B., B. A. Laffitte, P. H. Patel, M. A. Watson, K. E. Matsukuma, R. Walczak, J. L. Collins, T. F. Osborne and P. Tontonoz (2002). "Direct and indirect mechanisms for regulation of fatty acid synthase gene expression by liver X receptors." *J Biol Chem* **277**(13): 11019-25.
- Judge, A. R., A. Koncarevic, R. B. Hunter, H. C. Liou, R. W. Jackman and S. C. Kandarian (2007). "Role for IkappaBalpha, but not c-Rel, in skeletal muscle atrophy." *Am J Physiol Cell Physiol* **292**(1): C372-82.

## K.

- Kablar, B., A. Asakura, K. Krastel, C. Ying, L. L. May, D. J. Goldhamer and M. A. Rudnicki (1998). "MyoD and Myf-5 define the specification of musculature of distinct embryonic origin." *Biochem Cell Biol* **76**(6): 1079-91.
- Kallin, A., L. E. Johannessen, P. D. Cani, C. Y. Marbehant, A. Essaghir, F. Fougelle, P. Ferre, C. H. Heldin, N. M. Delzenne and J. B. Demoulin (2007). "SREBP-1 regulates the expression of heme oxygenase 1 and the phosphatidylinositol-3 kinase regulatory subunit p55 gamma." *J Lipid Res* **48**(7): 1628-36.
- Kamei, Y., S. Miura, T. Suganami, F. Akaike, S. Kanai, S. Sugita, A. Katsumata, H. Aburatani, T. G. Unterman, O. Ezaki and Y. Ogawa (2008). "Regulation of SREBP1c gene expression in skeletal muscle: role of retinoid X receptor/liver X receptor and forkhead-O1 transcription factor." *Endocrinology* **149**(5): 2293-305.
- Kassar-Duchossoy, L., E. Giaccone, B. Gayraud-Morel, A. Jory, D. Gomes and S. Tajbakhsh (2005). "Pax3/Pax7 mark a novel population of primitive myogenic cells during development." *Genes Dev* **19**(12): 1426-31.
- Kastner, S., M. C. Elias, A. J. Rivera and Z. Yablonka-Reuveni (2000). "Gene expression patterns of the fibroblast growth factors and their receptors during myogenesis of rat satellite cells." *J Histochem Cytochem* **48**(8): 1079-96.
- Kato, Y., V. V. Kravchenko, R. I. Tapping, J. Han, R. J. Ulevitch and J. D. Lee (1997). "BMK1/ERK5 regulates serum-induced early gene expression through transcription factor MEF2C." *Embo J* **16**(23): 7054-66.
- Kausch, C., J. Krutzfeldt, A. Witke, A. Rettig, O. Bachmann, K. Rett, S. Matthaei, F. Machicao, H. U. Haring and M. Stumvoll (2001). "Effects of troglitazone on cellular differentiation, insulin signaling, and



- glucose metabolism in cultured human skeletal muscle cells." *Biochem Biophys Res Commun* **280**(3): 664-74.
- Kaushal, S., J. W. Schneider, B. Nadal-Ginard and V. Mahdavi (1994). "Activation of the myogenic lineage by MEF2A, a factor that induces and cooperates with MyoD." *Science* **266**(5188): 1236-40.
- Kawamoto, T., M. Noshiro, M. Furukawa, K. K. Honda, A. Nakashima, T. Ueshima, E. Usui, Y. Katsura, K. Fujimoto, S. Honma, K. Honma, T. Hamada and Y. Kato (2006). "Effects of fasting and re-feeding on the expression of Dec1, Per1, and other clock-related genes." *J Biochem* **140**(3): 401-8.
- Kawamoto, T., M. Noshiro, F. Sato, K. Maemura, N. Takeda, R. Nagai, T. Iwata, K. Fujimoto, M. Furukawa, K. Miyazaki, S. Honma, K. Honma and Y. Kato (2004). "A novel autofeedback loop of Dec1 transcription involved in circadian rhythm regulation." *Biochem Biophys Res Commun* **313**(1): 117-24.
- Kawata, H., K. Yamada, K. Matsuura, Z. Shou and K. Miyamoto (2004). "Insulin regulates the expression of the enhancer of split- and hairy-related protein-2 gene via different pathways in 3T3-L1 adipocytes and L6 myotubes." *Horm Metab Res* **36**(8): 526-30.
- Kiens, B., B. Essen-Gustavsson, N. J. Christensen and B. Saltin (1993). "Skeletal muscle substrate utilization during submaximal exercise in man: effect of endurance training." *J Physiol* **469**: 459-78.
- Kiess, M., R. M. Gill and P. A. Hamel (1995). "Expression of the positive regulator of cell cycle progression, cyclin D3, is induced during differentiation of myoblasts into quiescent myotubes." *Oncogene* **10**(1): 159-66.
- Kim, H. J., M. Takahashi and O. Ezaki (1999a). "Fish oil feeding decreases mature sterol regulatory element-binding protein 1 (SREBP-1) by down-regulation of SREBP-1c mRNA in mouse liver. A possible mechanism for down-regulation of lipogenic enzyme mRNAs." *J Biol Chem* **274**(36): 25892-8.
- Kim, J. B., P. Sarraf, M. Wright, K. M. Yao, E. Mueller, G. Solanes, B. B. Lowell and B. M. Spiegelman (1998a). "Nutritional and insulin regulation of fatty acid synthetase and leptin gene expression through ADD1/SREBP1." *J Clin Invest* **101**(1): 1-9.
- Kim, J. B., G. D. Spotts, Y. D. Halvorsen, H. M. Shih, T. Ellenberger, H. C. Towle and B. M. Spiegelman (1995). "Dual DNA binding specificity of ADD1/SREBP1 controlled by a single amino acid in the basic helix-loop-helix domain." *Mol Cell Biol* **15**(5): 2582-8.
- Kim, J. B., H. M. Wright, M. Wright and B. M. Spiegelman (1998b). "ADD1/SREBP1 activates PPARgamma through the production of endogenous ligand." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(8): 4333-7.
- Kim, K. H., M. J. Song, J. Chung, H. Park and J. B. Kim (2005). "Hypoxia inhibits adipocyte differentiation in a HDAC-independent manner." *Biochem Biophys Res Commun* **333**(4): 1178-84.
- Kim, S. J. and C. R. Kahn (1997). "Insulin regulation of mitogen-activated protein kinase kinase (MEK), mitogen-activated protein kinase and casein kinase in the cell nucleus: a possible role in the regulation of gene expression." *Biochem J* **323** ( Pt 3): 621-7.
- Kim, Y. B., S. E. Nikoulina, T. P. Ciaraldi, R. R. Henry and B. B. Kahn (1999b). "Normal insulin-dependent activation of Akt/protein kinase B, with diminished activation of phosphoinositide 3-kinase, in muscle in type 2 diabetes." *J Clin Invest* **104**(6): 733-41.
- Kitzmann, M., G. Carnac, M. Vandromme, M. Primig, N. J. Lamb and A. Fernandez (1998). "The muscle regulatory factors MyoD and myf-5 undergo distinct cell cycle-specific expression in muscle cells." *J Cell Biol* **142**(6): 1447-59.
- Kitzmann, M. and A. Fernandez (2001). "Crosstalk between cell cycle regulators and the myogenic factor MyoD in skeletal myoblasts." *Cell Mol Life Sci* **58**(4): 571-9.
- Kitzmann, M., M. Vandromme, V. Schaeffer, G. Carnac, J. C. Labbe, N. Lamb and A. Fernandez (1999). "cdk1- and cdk2-mediated phosphorylation of MyoD Ser200 in growing C2 myoblasts: role in modulating MyoD half-life and myogenic activity." *Mol Cell Biol* **19**(4): 3167-76.
- Knapp, J. R., J. K. Davie, A. Myer, E. Meadows, E. N. Olson and W. H. Klein (2006). "Loss of myogenin in postnatal life leads to normal skeletal muscle but reduced body size." *Development* **133**(4): 601-10.
- Knoll, J. H., J. Wagstaff and M. Lalande (1993). "Cytogenetic and molecular studies in the Prader-Willi and Angelman syndromes: an overview." *Am J Med Genet* **46**(1): 2-6.
- Kokubo, H., Y. Lun and R. L. Johnson (1999). "Identification and expression of a novel family of bHLH cDNAs related to Drosophila hairy and enhancer of split." *Biochem Biophys Res Commun* **260**(2): 459-65.
- Kolehmainen, M., H. Vidal, E. Alhava and M. I. Uusitupa (2001). "Sterol regulatory element binding protein 1c (SREBP-1c) expression in human obesity." *Obes Res* **9**(11): 706-12.
- Kotzka, J., S. Lehr, G. Roth, H. Avci, B. Knebel and D. Muller-Wieland (2004). "Insulin-activated Erk-mitogen-activated protein kinases phosphorylate sterol regulatory element-binding Protein-2 at serine residues 432 and 455 in vivo." *J Biol Chem* **279**(21): 22404-11.
- Kotzka, J. and D. Muller-Wieland (2004). "Sterol regulatory element-binding protein (SREBP)-1: gene regulatory target for insulin resistance?" *Expert Opin Ther Targets* **8**(2): 141-9.
- Kotzka, J., D. Muller-Wieland, G. Roth, L. Kremer, M. Munck, S. Schurmann, B. Knebel and W. Krone (2000). "Sterol regulatory element binding proteins (SREBP)-1a and SREBP-2 are linked to the MAP-kinase cascade." *J Lipid Res* **41**(1): 99-108.

- Koves, T. R., J. R. Ussher, R. C. Noland, D. Slentz, M. Mosedale, O. Ilkayeva, J. Bain, R. Stevens, J. R. Dyck, C. B. Newgard, G. D. Lopaschuk and D. M. Muoio (2008). "Mitochondrial overload and incomplete fatty acid oxidation contribute to skeletal muscle insulin resistance." *Cell Metab* **7**(1): 45-56.
- Krook, A., M. Bjornholm, D. Galuska, X. J. Jiang, R. Fahlman, M. G. Myers, Jr., H. Wallberg-Henriksson and J. R. Zierath (2000). "Characterization of signal transduction and glucose transport in skeletal muscle from type 2 diabetic patients." *Diabetes* **49**(2): 284-92.
- Kuang, S., M. A. Gillespie and M. A. Rudnicki (2008). "Niche regulation of muscle satellite cell self-renewal and differentiation." *Cell Stem Cell* **2**(1): 22-31.
- Kuisk, I. R., H. Li, D. Tran and Y. Capetanaki (1996). "A single MEF2 site governs desmin transcription in both heart and skeletal muscle during mouse embryogenesis." *Dev Biol* **174**(1): 1-13.

## L.

- Lagirand-Cantaloube, J., K. Cornille, A. Csibi, S. Batonnet-Pichon, M. P. Leibovitch and S. A. Leibovitch (2009). "Inhibition of atrogen-1/MAFbx mediated MyoD proteolysis prevents skeletal muscle atrophy in vivo." *PLoS One* **4**(3): e4973.
- Lang, C. H., D. Huber and R. A. Frost (2007). "Burn-induced increase in atrogen-1 and MuRF-1 in skeletal muscle is glucocorticoid independent but downregulated by IGF-I." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **292**(1): R328-36.
- Lange, Y. and T. L. Steck (1998). "Four cholesterol-sensing proteins." *Curr Opin Struct Biol* **8**(4): 435-9.
- Langen, R. C., A. M. Schols, M. C. Kelders, E. F. Wouters and Y. M. Janssen-Heininger (2001). "Inflammatory cytokines inhibit myogenic differentiation through activation of nuclear factor-kappaB." *Faseb J* **15**(7): 1169-80.
- Langlands, K., X. Yin, G. Anand and E. V. Prochownik (1997). "Differential interactions of Id proteins with basic-helix-loop-helix transcription factors." *J Biol Chem* **272**(32): 19785-93.
- Lassar, A. B., J. N. Buskin, D. Lockshon, R. L. Davis, S. Apone, S. D. Hauschka and H. Weintraub (1989a). "MyoD is a sequence-specific DNA binding protein requiring a region of myc homology to bind to the muscle creatine kinase enhancer." *Cell* **58**(5): 823-31.
- Lassar, A. B., R. L. Davis, W. E. Wright, T. Kadesch, C. Murre, A. Voronova, D. Baltimore and H. Weintraub (1991). "Functional activity of myogenic HLH proteins requires hetero-oligomerization with E12/E47-like proteins in vivo." *Cell* **66**(2): 305-15.
- Lassar, A. B., M. J. Thayer, R. W. Overell and H. Weintraub (1989b). "Transformation by activated ras or fos prevents myogenesis by inhibiting expression of MyoD1." *Cell* **58**(4): 659-67.
- Lawler, J. F., Jr., M. Yin, A. M. Diehl, E. Roberts and S. Chatterjee (1998). "Tumor necrosis factor-alpha stimulates the maturation of sterol regulatory element binding protein-1 in human hepatocytes through the action of neutral sphingomyelinase." *J Biol Chem* **273**(9): 5053-9.
- Le Douarin, N. and G. Barq (1969). "[Use of Japanese quail cells as "biological markers" in experimental embryology]." *C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D* **269**(16): 1543-6.
- Le Grand, F. and M. A. Rudnicki (2007). "Skeletal muscle satellite cells and adult myogenesis." *Curr Opin Cell Biol* **19**(6): 628-33.
- Lecker, S. H., R. T. Jagoe, A. Gilbert, M. Gomes, V. Baracos, J. Bailey, S. R. Price, W. E. Mitch and A. L. Goldberg (2004). "Multiple types of skeletal muscle atrophy involve a common program of changes in gene expression." *Faseb J* **18**(1): 39-51.
- Lecker, S. H., V. Solomon, W. E. Mitch and A. L. Goldberg (1999). "Muscle protein breakdown and the critical role of the ubiquitin-proteasome pathway in normal and disease states." *J Nutr* **129**(1S Suppl): 227S-237S.
- Ledent, V., O. Paquet and M. Vervoort (2002). "Phylogenetic analysis of the human basic helix-loop-helix proteins." *Genome Biol* **3**(6): RESEARCH0030.
- Lee, S. J., T. Sekimoto, E. Yamashita, E. Nagoshi, A. Nakagawa, N. Imamoto, M. Yoshimura, H. Sakai, K. T. Chong, T. Tsukihara and Y. Yoneda (2003a). "The structure of importin-beta bound to SREBP-2: nuclear import of a transcription factor." *Science* **302**(5650): 1571-5.
- Lee, S. J., T. Sekimoto, E. Yamashita, E. Nagoshi, A. Nakagawa, H. Tanaka, Y. Yoneda and T. Tsukihara (2003b). "Crystallization and preliminary crystallographic analysis of the importin-beta-SREBP-2 complex." *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **59**(Pt 10): 1866-8.
- Legerlotz, K. and H. K. Smith (2008). "Role of MyoD in denervated, disused, and exercised muscle." *Muscle Nerve* **38**(3): 1087-100.
- Lehr, S., J. Kotzka, H. Avci, B. Knebel, S. Muller, F. G. Hanisch, S. Jacob, C. Haak, F. Susanto and D. Muller-Wieland (2005). "Effect of sterol regulatory element binding protein-1a on the mitochondrial protein pattern in human liver cells detected by 2D-DIGE." *Biochemistry* **44**(13): 5117-28.
- Lemerrier, C., R. Q. To, R. A. Carrasco and S. F. Konieczny (1998). "The basic helix-loop-helix transcription factor Mist1 functions as a transcriptional repressor of myoD." *Embo J* **17**(5): 1412-22.

- Letexier, D., O. Peroni, C. Pinteur and M. Beylot (2005). "In vivo expression of carbohydrate responsive element binding protein in lean and obese rats." *Diabetes Metab* **31**(6): 558-66.
- Li, H. and Y. Capetanaki (1993). "Regulation of the mouse desmin gene: transactivated by MyoD, myogenin, MRF4 and Myf5." *Nucleic Acids Res* **21**(2): 335-43.
- Li, H. and Y. Capetanaki (1994). "An E box in the desmin promoter cooperates with the E box and MEF-2 sites of a distal enhancer to direct muscle-specific transcription." *Embo J* **13**(15): 3580-9.
- Li, J., D. N. Grigoryev, S. Q. Ye, L. Thorne, A. R. Schwartz, P. L. Smith, C. P. O'Donnell and V. Y. Polotsky (2005a). "Chronic intermittent hypoxia upregulates genes of lipid biosynthesis in obese mice." *J Appl Physiol* **99**(5): 1643-8.
- Li, J., A. Nanayakkara, J. Jun, V. Savransky and V. Y. Polotsky (2007). "Effect of deficiency in SREBP cleavage-activating protein on lipid metabolism during intermittent hypoxia." *Physiol Genomics* **31**(2): 273-80.
- Li, J., L. N. Thorne, N. M. Punjabi, C. K. Sun, A. R. Schwartz, P. L. Smith, R. L. Marino, A. Rodriguez, W. C. Hubbard, C. P. O'Donnell and V. Y. Polotsky (2005b). "Intermittent hypoxia induces hyperlipidemia in lean mice." *Circ Res* **97**(7): 698-706.
- Li, L., J. C. Chambard, M. Karin and E. N. Olson (1992a). "Fos and Jun repress transcriptional activation by myogenin and MyoD: the amino terminus of Jun can mediate repression." *Genes Dev* **6**(4): 676-89.
- Li, L., R. Heller-Harrison, M. Czech and E. N. Olson (1992b). "Cyclic AMP-dependent protein kinase inhibits the activity of myogenic helix-loop-helix proteins." *Mol Cell Biol* **12**(10): 4478-85.
- Li, L., J. Zhou, G. James, R. Heller-Harrison, M. P. Czech and E. N. Olson (1992c). "FGF inactivates myogenic helix-loop-helix proteins through phosphorylation of a conserved protein kinase C site in their DNA-binding domains." *Cell* **71**(7): 1181-94.
- Li, Y., X. Song, Y. Ma, J. Liu, D. Yang and B. Yan (2004). "DNA binding, but not interaction with Bmal1, is responsible for DEC1-mediated transcription regulation of the circadian gene mPer1." *Biochem J* **382**(Pt 3): 895-904.
- Li, Y., M. Xie, X. Song, S. Gragen, K. Sachdeva, Y. Wan and B. Yan (2003). "DEC1 negatively regulates the expression of DEC2 through binding to the E-box in the proximal promoter." *J Biol Chem* **278**(19): 16899-907.
- Lillioja, S., A. A. Young, C. L. Culter, J. L. Ivy, W. G. Abbott, J. K. Zawadzki, H. Yki-Jarvinen, L. Christin, T. W. Secomb and C. Bogardus (1987). "Skeletal muscle capillary density and fiber type are possible determinants of in vivo insulin resistance in man." *J Clin Invest* **80**(2): 415-24.
- Lin, H., K. E. Yutzey and S. F. Konieczny (1991). "Muscle-specific expression of the troponin I gene requires interactions between helix-loop-helix muscle regulatory factors and ubiquitous transcription factors." *Mol Cell Biol* **11**(1): 267-80.
- Lin, J., R. Yang, P. T. Tarr, P. H. Wu, C. Handschin, S. Li, W. Yang, L. Pei, M. Uldry, P. Tontonoz, C. B. Newgard and B. M. Spiegelman (2005). "Hyperlipidemic effects of dietary saturated fats mediated through PGC-1beta coactivation of SREBP." *Cell* **120**(2): 261-73.
- Lindon, C., D. Montarras and C. Pinset (1998). "Cell cycle-regulated expression of the muscle determination factor Myf5 in proliferating myoblasts." *J Cell Biol* **140**(1): 111-8.
- Ljubisavljevic, M., A. Qureshi and N. Nagelkerke (2009). "The effects of neuropeptide Y on skeletal muscle contractile properties in streptozotocin diabetic rats." *Mol Cell Biochem*.
- Logette, E., C. Le Jossic-Corcus, D. Masson, S. Solier, A. Sequeira-Legrand, I. Dugail, S. Lemaire-Ewing, L. Desoche, E. Solary and L. Corcos (2005). "Caspase-2, a novel lipid sensor under the control of sterol regulatory element binding protein 2." *Mol Cell Biol* **25**(21): 9621-31.
- Lopez, J. M., M. K. Bennett, H. B. Sanchez, J. M. Rosenfeld and T. F. Osborne (1996). "Sterol regulation of acetyl coenzyme A carboxylase: a mechanism for coordinate control of cellular lipid." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(3): 1049-53.
- Loughna, P. T. and C. Brownson (1996). "Two myogenic regulatory factor transcripts exhibit muscle-specific responses to disuse and passive stretch in adult rats." *FEBS Lett* **390**(3): 304-6.
- Loughna, P. T., L. Gibbs, S. Bayol and C. Brownson (1996). "Changes in adult muscle phenotype in response to disuse and passive stretch." *Biochem Soc Trans* **24**(2): 284S.
- Lowe, D. A. and S. E. Alway (1999). "Stretch-induced myogenin, MyoD, and MRF4 expression and acute hypertrophy in quail slow-tonic muscle are not dependent upon satellite cell proliferation." *Cell Tissue Res* **296**(3): 531-9.
- Lowe, D. A., T. Lund and S. E. Alway (1998). "Hypertrophy-stimulated myogenic regulatory factor mRNA increases are attenuated in fast muscle of aged quails." *Am J Physiol* **275**(1 Pt 1): C155-62.
- Lu, J., T. A. McKinsey, C. L. Zhang and E. N. Olson (2000). "Regulation of skeletal myogenesis by association of the MEF2 transcription factor with class II histone deacetylases." *Mol Cell* **6**(2): 233-44.
- Lu, J., R. Webb, J. A. Richardson and E. N. Olson (1999). "MyoR: a muscle-restricted basic helix-loop-helix transcription factor that antagonizes the actions of MyoD." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(2): 552-7.

- Ludolph, D. C. and S. F. Konieczny (1995). "Transcription factor families: muscling in on the myogenic program." *Faseb J* **9**(15): 1595-604.
- Luo, D., V. M. Renault and T. A. Rando (2005). "The regulation of Notch signaling in muscle stem cell activation and postnatal myogenesis." *Semin Cell Dev Biol* **16**(4-5): 612-22.

## M.

- Ma, P. C., M. A. Rould, H. Weintraub and C. O. Pabo (1994). "Crystal structure of MyoD bHLH domain-DNA complex: perspectives on DNA recognition and implications for transcriptional activation." *Cell* **77**(3): 451-9.
- MacLean, H. E. and H. M. Kronenberg (2004). "Expression of Stra13 during mouse endochondral bone development." *Gene Expr Patterns* **4**(6): 633-6.
- Magana, M. M., S. H. Koo, H. C. Towle and T. F. Osborne (2000). "Different sterol regulatory element-binding protein-1 isoforms utilize distinct co-regulatory factors to activate the promoter for fatty acid synthase." *J Biol Chem* **275**(7): 4726-33.
- Magana, M. M. and T. F. Osborne (1996). "Two tandem binding sites for sterol regulatory element binding proteins are required for sterol regulation of fatty-acid synthase promoter." *J Biol Chem* **271**(51): 32689-94.
- Mahoney, D. J., A. Safdar, G. Parise, S. Melov, M. Fu, L. MacNeil, J. Kaczor, E. T. Payne and M. A. Tarnopolsky (2008). "Gene expression profiling in human skeletal muscle during recovery from eccentric exercise." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **294**(6): R1901-10.
- Mak, K. L., R. Q. To, Y. Kong and S. F. Konieczny (1992). "The MRF4 activation domain is required to induce muscle-specific gene expression." *Mol Cell Biol* **12**(10): 4334-46.
- Mal, A., M. Sturniolo, R. L. Schiltz, M. K. Ghosh and M. L. Harter (2001). "A role for histone deacetylase HDAC1 in modulating the transcriptional activity of MyoD: inhibition of the myogenic program." *Embo J* **20**(7): 1739-53.
- Malenfant, P., D. R. Joannisse, R. Theriault, B. H. Goodpaster, D. E. Kelley and J. A. Simoneau (2001). "Fat content in individual muscle fibers of lean and obese subjects." *Int J Obes Relat Metab Disord* **25**(9): 1316-21.
- Marchesini, G., G. Forlani, M. Zoli, P. Vannini and E. Pisi (1982). "Muscle protein breakdown in uncontrolled diabetes as assessed by urinary 3-methylhistidine excretion." *Diabetologia* **23**(5): 456-8.
- Martelli, F., C. Cenciarelli, G. Santarelli, B. Polikar, A. Felsani and M. Caruso (1994). "MyoD induces retinoblastoma gene expression during myogenic differentiation." *Oncogene* **9**(12): 3579-90.
- Massari, M. E. and C. Murre (2000). "Helix-loop-helix proteins: regulators of transcription in eucaryotic organisms." *Mol Cell Biol* **20**(2): 429-40.
- Mater, M. K., A. P. Thelen, D. A. Pan and D. B. Jump (1999). "Sterol response element-binding protein 1c (SREBP1c) is involved in the polyunsaturated fatty acid suppression of hepatic S14 gene transcription." *J Biol Chem* **274**(46): 32725-32.
- Matsuda, M., B. S. Korn, R. E. Hammer, Y. A. Moon, R. Komuro, J. D. Horton, J. L. Goldstein, M. S. Brown and I. Shimomura (2001). "SREBP cleavage-activating protein (SCAP) is required for increased lipid synthesis in liver induced by cholesterol deprivation and insulin elevation." *Genes Dev* **15**(10): 1206-16.
- Mauro, A. (1961). "Satellite cell of skeletal muscle fibers." *J Biophys Biochem Cytol* **9**: 493-5.
- McArdle, N., D. Hillman, L. Beilin and G. Watts (2007). "Metabolic risk factors for vascular disease in obstructive sleep apnea: a matched controlled study." *Am J Respir Crit Care Med* **175**(2): 190-5.
- McCroskery, S., M. Thomas, L. Maxwell, M. Sharma and R. Kambadur (2003). "Myostatin negatively regulates satellite cell activation and self-renewal." *J Cell Biol* **162**(6): 1135-47.
- McKinsey, T. A., C. L. Zhang and E. N. Olson (2001). "Control of muscle development by dueling HATs and HDACs." *Curr Opin Genet Dev* **11**(5): 497-504.
- McPherson, R. and A. Gauthier (2004). "Molecular regulation of SREBP function: the Insig-SCAP connection and isoform-specific modulation of lipid synthesis." *Biochem Cell Biol* **82**(1): 201-11.
- Megeney, L. A., B. Kablar, K. Garrett, J. E. Anderson and M. A. Rudnicki (1996). "MyoD is required for myogenic stem cell function in adult skeletal muscle." *Genes Dev* **10**(10): 1173-83.
- Merrill, G. F., E. J. Kurth, D. G. Hardie and W. W. Winder (1997). "AICA riboside increases AMP-activated protein kinase, fatty acid oxidation, and glucose uptake in rat muscle." *Am J Physiol* **273**(6 Pt 1): E1107-12.
- Messenguy, F. and E. Dubois (2003). "Role of MADS box proteins and their cofactors in combinatorial control of gene expression and cell development." *Gene* **316**: 1-21.
- Michelson, A. M., S. M. Abmayr, M. Bate, A. M. Arias and T. Maniatis (1990). "Expression of a MyoD family member prefigures muscle pattern in Drosophila embryos." *Genes Dev* **4**(12A): 2086-97.

- Minasi, M. G., M. Riminucci, L. De Angelis, U. Borello, B. Berarducci, A. Innocenzi, A. Caprioli, D. Sirabella, M. Baiocchi, R. De Maria, R. Boratto, T. Jaffredo, V. Broccoli, P. Bianco and G. Cossu (2002). "The meso-angioblast: a multipotent, self-renewing cell that originates from the dorsal aorta and differentiates into most mesodermal tissues." *Development* **129**(11): 2773-83.
- Minehira, K., N. Vega, H. Vidal, K. Acheson and L. Tappy (2004). "Effect of carbohydrate overfeeding on whole body macronutrient metabolism and expression of lipogenic enzymes in adipose tissue of lean and overweight humans." *Int J Obes Relat Metab Disord* **28**(10): 1291-8.
- Miner, J. H. and B. Wold (1990). "Herculin, a fourth member of the MyoD family of myogenic regulatory genes." *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**(3): 1089-93.
- Miner, J. H. and B. J. Wold (1991). "c-myc inhibition of MyoD and myogenin-initiated myogenic differentiation." *Mol Cell Biol* **11**(5): 2842-51.
- Mingrone, G., G. Rosa, A. V. Greco, M. Manco, N. Vega, G. Nanni, M. Castagneto and H. Vidal (2003). "Intramyocytic lipid accumulation and SREBP-1c expression are related to insulin resistance and cardiovascular risk in morbid obesity." *Atherosclerosis* **170**(1): 155-61.
- Miserez, A. R., G. Cao, L. C. Probst and H. H. Hobbs (1997). "Structure of the human gene encoding sterol regulatory element binding protein 2 (SREBF2)." *Genomics* **40**(1): 31-40.
- Mitro, N., P. A. Mak, L. Vargas, C. Godio, E. Hampton, V. Molteni, A. Kreuzsch and E. Saez (2007). "The nuclear receptor LXR is a glucose sensor." *Nature* **445**(7124): 219-23.
- Mitsui, K., M. Shirakata and B. M. Paterson (1993). "Phosphorylation inhibits the DNA-binding activity of MyoD homodimers but not MyoD-E12 heterodimers." *J Biol Chem* **268**(32): 24415-20.
- Miyazaki, K., T. Kawamoto, K. Tanimoto, M. Nishiyama, H. Honda and Y. Kato (2002). "Identification of functional hypoxia response elements in the promoter region of the DEC1 and DEC2 genes." *J Biol Chem* **277**(49): 47014-21.
- Miyazaki, M., A. Dobrzyn, W. C. Man, K. Chu, H. Sampath, H. J. Kim and J. M. Ntambi (2004). "Stearoyl-CoA desaturase 1 gene expression is necessary for fructose-mediated induction of lipogenic gene expression by sterol regulatory element-binding protein-1c-dependent and -independent mechanisms." *J Biol Chem* **279**(24): 25164-71.
- Mole, P. A., L. B. Oscai and J. O. Holloszy (1971). "Adaptation of muscle to exercise. Increase in levels of palmityl Coa synthetase, carnitine palmityltransferase, and palmityl Coa dehydrogenase, and in the capacity to oxidize fatty acids." *J Clin Invest* **50**(11): 2323-30.
- Molkentin, J. D., B. L. Black, J. F. Martin and E. N. Olson (1995). "Cooperative activation of muscle gene expression by MEF2 and myogenic bHLH proteins." *Cell* **83**(7): 1125-36.
- Molkentin, J. D. and E. N. Olson (1996a). "Combinatorial control of muscle development by basic helix-loop-helix and MADS-box transcription factors." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(18): 9366-73.
- Molkentin, J. D. and E. N. Olson (1996b). "Defining the regulatory networks for muscle development." *Curr Opin Genet Dev* **6**(4): 445-53.
- Montarras, D., J. Chelly, E. Bober, H. Arnold, M. O. Ott, F. Gros and C. Pinset (1991). "Developmental patterns in the expression of Myf5, MyoD, myogenin, and MRF4 during myogenesis." *New Biol* **3**(6): 592-600.
- Morgan, T. E., F. A. Short and L. A. Cobb (1969). "Effect of long-term exercise on skeletal muscle lipid composition." *Am J Physiol* **216**(1): 82-6.
- Mozdziak, P. E., M. L. Greaser and E. Schultz (1998). "Myogenin, MyoD, and myosin expression after pharmacologically and surgically induced hypertrophy." *J Appl Physiol* **84**(4): 1359-64.
- Mozdziak, P. E., M. L. Greaser and E. Schultz (1999). "Myogenin, MyoD, and myosin heavy chain isoform expression following hindlimb suspension." *Aviat Space Environ Med* **70**(5): 511-6.
- Muir, A. R., A. H. Kanji and D. Allbrook (1965). "The structure of the satellite cells in skeletal muscle." *J Anat* **99**(Pt 3): 435-44.
- Munsterberg, A. E., J. Kitajewski, D. A. Bumcrot, A. P. McMahon and A. B. Lassar (1995). "Combinatorial signaling by Sonic hedgehog and Wnt family members induces myogenic bHLH gene expression in the somite." *Genes Dev* **9**(23): 2911-22.
- Murre, C., P. S. McCaw and D. Baltimore (1989a). "A new DNA binding and dimerization motif in immunoglobulin enhancer binding, daughterless, MyoD, and myc proteins." *Cell* **56**(5): 777-83.
- Murre, C., P. S. McCaw, H. Vaessin, M. Caudy, L. Y. Jan, Y. N. Jan, C. V. Cabrera, J. N. Buskin, S. D. Hauschka, A. B. Lassar and et al. (1989b). "Interactions between heterologous helix-loop-helix proteins generate complexes that bind specifically to a common DNA sequence." *Cell* **58**(3): 537-44.
- Murton, A. J., D. Constantin and P. L. Greenhaff (2008). "The involvement of the ubiquitin proteasome system in human skeletal muscle remodelling and atrophy." *Biochim Biophys Acta* **1782**(12): 730-43.
- Musaro, A., K. McCullagh, A. Paul, L. Houghton, G. Dobrowolny, M. Molinaro, E. R. Barton, H. L. Sweeney and N. Rosenthal (2001). "Localized IGF-1 transgene expression sustains hypertrophy and regeneration in senescent skeletal muscle." *Nat Genet* **27**(2): 195-200.
- Musaro, A., K. J. McCullagh, F. J. Naya, E. N. Olson and N. Rosenthal (1999). "IGF-1 induces skeletal myocyte hypertrophy through calcineurin in association with GATA-2 and NF-ATc1." *Nature* **400**(6744): 581-5.

Muscat, G. E., B. L. Wagner, J. Hou, R. K. Tangirala, E. D. Bischoff, P. Rohde, M. Petrowski, J. Li, G. Shao, G. Macondray and I. G. Schulman (2002). "Regulation of cholesterol homeostasis and lipid metabolism in skeletal muscle by liver X receptors." *J Biol Chem* **277**(43): 40722-8.

## N.

- Naar, A. M., P. A. Beurang, S. Zhou, S. Abraham, W. Solomon and R. Tjian (1999). "Composite co-activator ARC mediates chromatin-directed transcriptional activation." *Nature* **398**(6730): 828-32.
- Nabeshima, Y., K. Hanaoka, M. Hayasaka, E. Esumi, S. Li, I. Nonaka and Y. Nabeshima (1993). "Myogenin gene disruption results in perinatal lethality because of severe muscle defect." *Nature* **364**(6437): 532-5.
- Nadeau, K. J., L. B. Ehlers, L. E. Aguirre, R. L. Moore, K. N. Jew, H. K. Ortmeyer, B. C. Hansen, J. E. Reusch and B. Draznin (2006). "Exercise training and calorie restriction increase SREBP-1 expression and intramuscular triglyceride in skeletal muscle." *Am J Physiol Endocrinol Metab* **291**(1): E90-8.
- Nadeau, K. J., L. B. Ehlers, L. E. Aguirre, J. E. Reusch and B. Draznin (2007). "Discordance between intramuscular triglyceride and insulin sensitivity in skeletal muscle of Zucker diabetic rats after treatment with fenofibrate and rosiglitazone." *Diabetes Obes Metab* **9**(5): 714-23.
- Nadeau, K. J., J. W. Leitner, I. Gurerich and B. Draznin (2004). "Insulin regulation of sterol regulatory element-binding protein-1 expression in L-6 muscle cells and 3T3 L1 adipocytes." *J Biol Chem* **279**(33): 34380-7.
- Nadler, S. T., J. P. Stoehr, K. L. Schueler, G. Tanimoto, B. S. Yandell and A. D. Attie (2000). "The expression of adipogenic genes is decreased in obesity and diabetes mellitus." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(21): 11371-6.
- Nagoshi, E., N. Imamoto, R. Sato and Y. Yoneda (1999). "Nuclear import of sterol regulatory element-binding protein-2, a basic helix-loop-helix-leucine zipper (bHLH-Zip)-containing transcription factor, occurs through the direct interaction of importin beta with HLH-Zip." *Mol Biol Cell* **10**(7): 2221-33.
- Nagoshi, E. and Y. Yoneda (2001). "Dimerization of sterol regulatory element-binding protein 2 via the helix-loop-helix-leucine zipper domain is a prerequisite for its nuclear localization mediated by importin beta." *Mol Cell Biol* **21**(8): 2779-89.
- Naidu, P. S., D. C. Ludolph, R. Q. To, T. J. Hinterberger and S. F. Konieczny (1995). "Myogenin and MEF2 function synergistically to activate the MRF4 promoter during myogenesis." *Mol Cell Biol* **15**(5): 2707-18.
- Nakamura, M. T., Y. Cheon, Y. Li and T. Y. Nara (2004). "Mechanisms of regulation of gene expression by fatty acids." *Lipids* **39**(11): 1077-83.
- Nakatani, T., A. Katsumata, S. Miura, Y. Kamei and O. Ezaki (2005). "Effects of fish oil feeding and fasting on LXRalpha/RXRalpha binding to LXRE in the SREBP-1c promoter in mouse liver." *Biochim Biophys Acta* **1736**(1): 77-86.
- Nakatani, T., E. Mizuhara, Y. Minaki, Y. Sakamoto and Y. Ono (2004). "Helt, a novel basic-helix-loop-helix transcriptional repressor expressed in the developing central nervous system." *J Biol Chem* **279**(16): 16356-67.
- Nakhooda, A. F., C. N. Wei and E. B. Marliss (1980). "Muscle protein catabolism in diabetes: 3-methylhistidine excretion in the spontaneously diabetic "BB" rat." *Metabolism* **29**(12): 1272-7.
- Navankasattusas, S., H. Zhu, A. V. Garcia, S. M. Evans and K. R. Chien (1992). "A ubiquitous factor (HF-1a) and a distinct muscle factor (HF-1b/MEF-2) form an E-box-independent pathway for cardiac muscle gene expression." *Mol Cell Biol* **12**(4): 1469-79.
- Naya, F. J., B. Mercer, J. Shelton, J. A. Richardson, R. S. Williams and E. N. Olson (2000). "Stimulation of slow skeletal muscle fiber gene expression by calcineurin in vivo." *J Biol Chem* **275**(7): 4545-8.
- Neuhold, L. A. and B. Wold (1993). "HLH forced dimers: tethering MyoD to E47 generates a dominant positive myogenic factor insulated from negative regulation by Id." *Cell* **74**(6): 1033-42.
- Newman, A. B., F. J. Nieto, U. Guidry, B. K. Lind, S. Redline, T. G. Pickering and S. F. Quan (2001). "Relation of sleep-disordered breathing to cardiovascular disease risk factors: the Sleep Heart Health Study." *Am J Epidemiol* **154**(1): 50-9.
- Nohturfft, A., M. S. Brown and J. L. Goldstein (1998a). "Sterols regulate processing of carbohydrate chains of wild-type SREBP cleavage-activating protein (SCAP), but not sterol-resistant mutants Y298C or D443N." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(22): 12848-53.
- Nohturfft, A., M. S. Brown and J. L. Goldstein (1998b). "Topology of SREBP cleavage-activating protein, a polytopic membrane protein with a sterol-sensing domain." *J Biol Chem* **273**(27): 17243-50.
- Nohturfft, A., R. A. DeBose-Boyd, S. Scheek, J. L. Goldstein and M. S. Brown (1999). "Sterols regulate cycling of SREBP cleavage-activating protein (SCAP) between endoplasmic reticulum and Golgi." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(20): 11235-40.

- Norton, J. D. and G. T. Atherton (1998). "Coupling of cell growth control and apoptosis functions of Id proteins." *Mol Cell Biol* **18**(4): 2371-81.
- Noshiro, M., E. Usui, T. Kawamoto, F. Sato, A. Nakashima, T. Ueshima, K. Honda, K. Fujimoto, S. Honma, K. Honma, M. Makishima and Y. Kato (2009). "Liver X receptors (LXRalpha and LXRbeta) are potent regulators for hepatic Dec1 expression." *Genes Cells* **14**(1): 29-40.
- Novitch, B. G., G. J. Mulligan, T. Jacks and A. B. Lassar (1996). "Skeletal muscle cells lacking the retinoblastoma protein display defects in muscle gene expression and accumulate in S and G2 phases of the cell cycle." *J Cell Biol* **135**(2): 441-56.
- Novitch, B. G., D. B. Spicer, P. S. Kim, W. L. Cheung and A. B. Lassar (1999). "pRb is required for MEF2-dependent gene expression as well as cell-cycle arrest during skeletal muscle differentiation." *Curr Biol* **9**(9): 449-59.

## O.

- O'Brien, R. M. and D. K. Granner (1996). "Regulation of gene expression by insulin." *Physiol Rev* **76**(4): 1109-61.
- Oberbach, A., Y. Bossenz, S. Lehmann, J. Niebauer, V. Adams, R. Paschke, M. R. Schon, M. Bluher and K. Punkt (2006). "Altered fiber distribution and fiber-specific glycolytic and oxidative enzyme activity in skeletal muscle of patients with type 2 diabetes." *Diabetes Care* **29**(4): 895-900.
- Okada, T., Y. Kawano, T. Sakakibara, O. Hazeki and M. Ui (1994). "Essential role of phosphatidylinositol 3-kinase in insulin-induced glucose transport and antilipolysis in rat adipocytes. Studies with a selective inhibitor wortmannin." *J Biol Chem* **269**(5): 3568-73.
- Olbryt, M., M. Jarzab, J. Jazowiecka-Rakus, K. Simek, S. Szala and A. Sochanik (2006). "Gene expression profile of B 16(F10) murine melanoma cells exposed to hypoxic conditions in vitro." *Gene Expr* **13**(3): 191-203.
- Olguin, H. C., Z. Yang, S. J. Tapscott and B. B. Olwin (2007). "Reciprocal inhibition between Pax7 and muscle regulatory factors modulates myogenic cell fate determination." *J Cell Biol* **177**(5): 769-79.
- Oliner, J. D., J. M. Andresen, S. K. Hansen, S. Zhou and R. Tjian (1996). "SREBP transcriptional activity is mediated through an interaction with the CREB-binding protein." *Genes Dev* **10**(22): 2903-11.
- Olson, E. N. (1990). "MyoD family: a paradigm for development?" *Genes Dev* **4**(9): 1454-61.
- Olson, E. N., H. H. Arnold, P. W. Rigby and B. J. Wold (1996). "Know your neighbors: three phenotypes in null mutants of the myogenic bHLH gene MRF4." *Cell* **85**(1): 1-4.
- Olson, E. N., M. Perry and R. A. Schulz (1995). "Regulation of muscle differentiation by the MEF2 family of MADS box transcription factors." *Dev Biol* **172**(1): 2-14.
- Olson, E. N., E. Sternberg, J. S. Hu, G. Spizz and C. Wilcox (1986). "Regulation of myogenic differentiation by type beta transforming growth factor." *J Cell Biol* **103**(5): 1799-805.
- Ordahl, C. P. and N. M. Le Douarin (1992). "Two myogenic lineages within the developing somite." *Development* **114**(2): 339-53.
- Osborne, T. F. (2000). "Sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs): key regulators of nutritional homeostasis and insulin action." *J Biol Chem* **275**(42): 32379-82.
- Ott, M. O., E. Bober, G. Lyons, H. Arnold and M. Buckingham (1991). "Early expression of the myogenic regulatory gene, myf-5, in precursor cells of skeletal muscle in the mouse embryo." *Development* **111**(4): 1097-107.
- Ou, J., H. Tu, B. Shan, A. Luk, R. A. DeBose-Boyd, Y. Bashmakov, J. L. Goldstein and M. S. Brown (2001). "Unsaturated fatty acids inhibit transcription of the sterol regulatory element-binding protein-1c (SREBP-1c) gene by antagonizing ligand-dependent activation of the LXR." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(11): 6027-32.

## P.

- Pai, J. T., M. S. Brown and J. L. Goldstein (1996). "Purification and cDNA cloning of a second apoptosis-related cysteine protease that cleaves and activates sterol regulatory element binding proteins." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(11): 5437-42.
- Parikh, H., E. Carlsson, W. A. Chutkow, L. E. Johansson, H. Storgaard, P. Poulsen, R. Saxena, C. Ladd, P. C. Schulze, M. J. Mazzini, C. B. Jensen, A. Krook, M. Bjornholm, H. Tornqvist, J. R. Zierath, M. Ridderstrale, D. Altshuler, R. T. Lee, A. Vaag, L. C. Groop and V. K. Mootha (2007). "TXNIP regulates peripheral glucose metabolism in humans." *PLoS Med* **4**(5): e158.
- Parmacek, M. S., H. S. Ip, F. Jung, T. Shen, J. F. Martin, A. J. Vora, E. N. Olson and J. M. Leiden (1994). "A novel myogenic regulatory circuit controls slow/cardiac troponin C gene transcription in skeletal muscle." *Mol Cell Biol* **14**(3): 1870-85.

- Paroush, Z., R. L. Finley, Jr., T. Kidd, S. M. Wainwright, P. W. Ingham, R. Brent and D. Ish-Horowicz (1994). "Groucho is required for Drosophila neurogenesis, segmentation, and sex determination and interacts directly with hairy-related bHLH proteins." *Cell* **79**(5): 805-15.
- Parraga, A., L. Bellosolell, A. R. Ferre-D'Amare and S. K. Burley (1998). "Co-crystal structure of sterol regulatory element binding protein 1a at 2.3 Å resolution." *Structure* **6**(5): 661-72.
- Patapoutian, A., J. K. Yoon, J. H. Miner, S. Wang, K. Stark and B. Wold (1995). "Disruption of the mouse MRF4 gene identifies multiple waves of myogenesis in the myotome." *Development* **121**(10): 3347-58.
- Paterson, B. M., U. Walldorf, J. Eldridge, A. Dubendorfer, M. Frasch and W. J. Gehring (1991). "The Drosophila homologue of vertebrate myogenic-determination genes encodes a transiently expressed nuclear protein marking primary myogenic cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(9): 3782-6.
- Pedersen, M., H. Bruunsgaard, N. Weis, H. W. Hendel, B. U. Andreassen, E. Eldrup, F. Dela and B. K. Pedersen (2003). "Circulating levels of TNF-alpha and IL-6-relation to truncal fat mass and muscle mass in healthy elderly individuals and in patients with type-2 diabetes." *Mech Ageing Dev* **124**(4): 495-502.
- Peng, Y., E. J. Schwarz, M. A. Lazar, A. Genin, N. B. Spinner and R. Taub (1997). "Cloning, human chromosomal assignment, and adipose and hepatic expression of the CL-6/INSIG1 gene." *Genomics* **43**(3): 278-84.
- Penn, B. H., D. A. Bergstrom, F. J. Dilworth, E. Bengal and S. J. Tapscott (2004). "A MyoD-generated feed-forward circuit temporally patterns gene expression during skeletal muscle differentiation." *Genes Dev* **18**(19): 2348-53.
- Perry, R. L. and M. A. Rudnick (2000). "Molecular mechanisms regulating myogenic determination and differentiation." *Front Biosci* **5**: D750-67.
- Philippou, A., A. Halapas, M. Maridaki and M. Koutsilieris (2007). "Type I insulin-like growth factor receptor signaling in skeletal muscle regeneration and hypertrophy." *J Musculoskelet Neuronal Interact* **7**(3): 208-18.
- Piette, J., J. L. Bessereau, M. Huchet and J. P. Changeux (1990). "Two adjacent MyoD1-binding sites regulate expression of the acetylcholine receptor alpha-subunit gene." *Nature* **345**(6273): 353-5.
- Polesskaya, A., I. Naguibneva, A. Duquet, E. Bengal, P. Robin and A. Harel-Bellan (2001a). "Interaction between acetylated MyoD and the bromodomain of CBP and/or p300." *Mol Cell Biol* **21**(16): 5312-20.
- Polesskaya, A., I. Naguibneva, L. Fritsch, A. Duquet, S. Ait-Si-Ali, P. Robin, A. Vervisch, L. L. Pritchard, P. Cole and A. Harel-Bellan (2001b). "CBP/p300 and muscle differentiation: no HAT, no muscle." *Embo J* **20**(23): 6816-25.
- Porstmann, T., C. R. Santos, B. Griffiths, M. Cully, M. Wu, S. Leever, J. R. Griffiths, Y. L. Chung and A. Schulze (2008). "SREBP activity is regulated by mTORC1 and contributes to Akt-dependent cell growth." *Cell Metab* **8**(3): 224-36.
- Potthoff, M. J., M. A. Arnold, J. McAnally, J. A. Richardson, R. Bassel-Duby and E. N. Olson (2007). "Regulation of skeletal muscle sarcomere integrity and postnatal muscle function by Mef2c." *Mol Cell Biol* **27**(23): 8143-51.
- Potthoff, M. J. and E. N. Olson (2007). "MEF2: a central regulator of diverse developmental programs." *Development* **134**(23): 4131-40.
- Pourquie, O., M. Coltey, C. Breant and N. M. Le Douarin (1995). "Control of somite patterning by signals from the lateral plate." *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(8): 3219-23.
- Pourquie, O., C. M. Fan, M. Coltey, E. Hirsinger, Y. Watanabe, C. Breant, P. Francis-West, P. Brickell, M. Tessier-Lavigne and N. M. Le Douarin (1996). "Lateral and axial signals involved in avian somite patterning: a role for BMP4." *Cell* **84**(3): 461-71.
- Preedy, V. R., D. M. Smith and P. H. Sugden (1985). "The effects of 6 hours of hypoxia on protein synthesis in rat tissues in vivo and in vitro." *Biochem J* **228**(1): 179-85.
- Price, S. R., J. L. Bailey, X. Wang, C. Jurkovitz, B. K. England, X. Ding, L. S. Phillips and W. E. Mitch (1996). "Muscle wasting in insulinopenic rats results from activation of the ATP-dependent, ubiquitin-proteasome proteolytic pathway by a mechanism including gene transcription." *J Clin Invest* **98**(8): 1703-8.
- Pruchnic, R., A. Katsiaras, J. He, D. E. Kelley, C. Winters and B. H. Goodpaster (2004). "Exercise training increases intramyocellular lipid and oxidative capacity in older adults." *Am J Physiol Endocrinol Metab* **287**(5): E857-62.
- Punjabi, N. M., J. D. Sorkin, L. I. Katzel, A. P. Goldberg, A. R. Schwartz and P. L. Smith (2002). "Sleep-disordered breathing and insulin resistance in middle-aged and overweight men." *Am J Respir Crit Care Med* **165**(5): 677-82.
- Puri, P. L., M. L. Avantaggiati, C. Balsano, N. Sang, A. Graessmann, A. Giordano and M. Levrero (1997a). "p300 is required for MyoD-dependent cell cycle arrest and muscle-specific gene transcription." *Embo J* **16**(2): 369-83.



- Puri, P. L., C. Balsano, V. L. Burgio, P. Chirillo, G. Natoli, L. Ricci, E. Mattei, A. Graessmann and M. Levrero (1997b). "MyoD prevents cyclinA/cdk2 containing E2F complexes formation in terminally differentiated myocytes." *Oncogene* **14**(10): 1171-84.
- Puri, P. L., S. Iezzi, P. Stiegler, T. T. Chen, R. L. Schiltz, G. E. Muscat, A. Giordano, L. Kedes, J. Y. Wang and V. Sartorelli (2001). "Class I histone deacetylases sequentially interact with MyoD and pRb during skeletal myogenesis." *Mol Cell* **8**(4): 885-97.
- Puri, P. L. and V. Sartorelli (2000). "Regulation of muscle regulatory factors by DNA-binding, interacting proteins, and post-transcriptional modifications." *J Cell Physiol* **185**(2): 155-73.
- Puri, P. L., V. Sartorelli, X. J. Yang, Y. Hamamori, V. V. Ogryzko, B. H. Howard, L. Kedes, J. Y. Wang, A. Graessmann, Y. Nakatani and M. Levrero (1997c). "Differential roles of p300 and PCAF acetyltransferases in muscle differentiation." *Mol Cell* **1**(1): 35-45.

## R.

- Radhakrishnan, A., J. L. Goldstein, J. G. McDonald and M. S. Brown (2008). "Switch-like control of SREBP-2 transport triggered by small changes in ER cholesterol: a delicate balance." *Cell Metab* **8**(6): 512-21.
- Raghow, R., C. Yellaturu, X. Deng, E. A. Park and M. B. Elam (2008). "SREBPs: the crossroads of physiological and pathological lipid homeostasis." *Trends Endocrinol Metab* **19**(2): 65-73.
- Rao, S. S., C. Chu and D. S. Kohtz (1994). "Ectopic expression of cyclin D1 prevents activation of gene transcription by myogenic basic helix-loop-helix regulators." *Mol Cell Biol* **14**(8): 5259-67.
- Rawls, A., J. H. Morris, M. Rudnicki, T. Braun, H. H. Arnold, W. H. Klein and E. N. Olson (1995). "Myogenin's functions do not overlap with those of MyoD or Myf-5 during mouse embryogenesis." *Dev Biol* **172**(1): 37-50.
- Rawls, A., M. R. Valdez, W. Zhang, J. Richardson, W. H. Klein and E. N. Olson (1998). "Overlapping functions of the myogenic bHLH genes MRF4 and MyoD revealed in double mutant mice." *Development* **125**(13): 2349-58.
- Reed, B. D., A. E. Charos, A. M. Szekely, S. M. Weissman and M. Snyder (2008). "Genome-wide occupancy of SREBP1 and its partners NFY and SP1 reveals novel functional roles and combinatorial regulation of distinct classes of genes." *PLoS Genet* **4**(7): e1000133.
- Relaix, F., D. Montarras, S. Zaffran, B. Gayraud-Morel, D. Rocancourt, S. Tajbakhsh, A. Mansouri, A. Cumano and M. Buckingham (2006). "Pax3 and Pax7 have distinct and overlapping functions in adult muscle progenitor cells." *J Cell Biol* **172**(1): 91-102.
- Relaix, F., D. Rocancourt, A. Mansouri and M. Buckingham (2005). "A Pax3/Pax7-dependent population of skeletal muscle progenitor cells." *Nature* **435**(7044): 948-53.
- Rennie, M. J., P. Babij, J. R. Sutton, W. J. Tonkins, W. W. Read, C. Ford and D. Halliday (1983). "Effects of acute hypoxia on forearm leucine metabolism." *Prog Clin Biol Res* **136**: 317-23.
- Repa, J. J., G. Liang, J. Ou, Y. Bashmakov, J. M. Lobaccaro, I. Shimomura, B. Shan, M. S. Brown, J. L. Goldstein and D. J. Mangelsdorf (2000). "Regulation of mouse sterol regulatory element-binding protein-1c gene (SREBP-1c) by oxysterol receptors, LXRalpha and LXRbeta." *Genes Dev* **14**(22): 2819-30.
- Revathi, C. J., A. Chattopadhyay and U. K. Srinivas (1994). "Change in membrane organization induced by heat shock." *Biochem Mol Biol Int* **32**(5): 941-50.
- Rhodes, S. J. and S. F. Konieczny (1989). "Identification of MRF4: a new member of the muscle regulatory factor gene family." *Genes Dev* **3**(12B): 2050-61.
- Robichon, C. and I. Dugail (2007). "De novo cholesterol synthesis at the crossroads of adaptive response to extracellular stress through SREBP." *Biochimie* **89**(2): 260-4.
- Robichon, C., M. Varret, X. Le Liepvre, F. Lasnier, E. Hajdich, P. Ferre and I. Dugail (2006). "DnaJA4 is a SREBP-regulated chaperone involved in the cholesterol biosynthesis pathway." *Biochim Biophys Acta* **1761**(9): 1107-13.
- Rome, S., K. Clement, R. Rabasa-Lhoret, E. Loizon, C. Poitou, G. S. Barsh, J. P. Riou, M. Laville and H. Vidal (2003). "Microarray profiling of human skeletal muscle reveals that insulin regulates approximately 800 genes during a hyperinsulinemic clamp." *J Biol Chem* **278**(20): 18063-8.
- Rome, S., V. Lecomte, E. Meugnier, J. Rieusset, C. Debarb, V. Euthine, H. Vidal and E. Lefai (2008). "Microarray analyses of SREBP-1a and SREBP-1c target genes identify new regulatory pathways in muscle." *Physiol Genomics* **34**(3): 327-37.
- Rome, S., E. Meugnier, V. Lecomte, V. Berbe, J. Besson, C. Cerutti, S. Pesenti, A. Granjon, E. Disse, K. Clement, E. Lefai, M. Laville and H. Vidal (2009). "Microarray analysis of genes with impaired insulin regulation in the skeletal muscle of type 2 diabetic patients indicates the involvement of basic helix-loop-helix domain-containing, class B, 2 protein (BHLHB2)." *Diabetologia*.

- Rommel, C., S. C. Bodine, B. A. Clarke, R. Rossman, L. Nunez, T. N. Stitt, G. D. Yancopoulos and D. J. Glass (2001). "Mediation of IGF-1-induced skeletal myotube hypertrophy by PI(3)K/Akt/mTOR and PI(3)K/Akt/GSK3 pathways." *Nat Cell Biol* **3**(11): 1009-13.
- Rossner, M. J., J. Dorr, P. Gass, M. H. Schwab and K. A. Nave (1997). "SHARPs: mammalian enhancer-of-split- and hairy-related proteins coupled to neuronal stimulation." *Mol Cell Neurosci* **9**(5-6): 460-75.
- Roth, G., J. Kotzka, L. Kremer, S. Lehr, C. Lohaus, H. E. Meyer, W. Krone and D. Muller-Wieland (2000). "MAP kinases Erk1/2 phosphorylate sterol regulatory element-binding protein (SREBP)-1a at serine 117 in vitro." *J Biol Chem* **275**(43): 33302-7.
- Roubenoff, R. (2000). "Sarcopenic obesity: does muscle loss cause fat gain? Lessons from rheumatoid arthritis and osteoarthritis." *Ann N Y Acad Sci* **904**: 553-7.
- Roubenoff, R. and V. A. Hughes (2000). "Sarcopenia: current concepts." *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* **55**(12): M716-24.
- Roy, K., I. L. de la Serna and A. N. Imbalzano (2002). "The myogenic basic helix-loop-helix family of transcription factors shows similar requirements for SWI/SNF chromatin remodeling enzymes during muscle differentiation in culture." *J Biol Chem* **277**(37): 33818-24.
- Roy, R. R., S. R. Monke, D. L. Allen and V. R. Edgerton (1999). "Modulation of myonuclear number in functionally overloaded and exercised rat plantaris fibers." *J Appl Physiol* **87**(2): 634-42.
- Ruan, X. Z., Z. Varghese, S. H. Powis and J. F. Moorhead (2001). "Dysregulation of LDL receptor under the influence of inflammatory cytokines: a new pathway for foam cell formation." *Kidney Int* **60**(5): 1716-25.
- Rudnicki, M. A., T. Braun, S. Hinuma and R. Jaenisch (1992). "Inactivation of MyoD in mice leads to up-regulation of the myogenic HLH gene Myf-5 and results in apparently normal muscle development." *Cell* **71**(3): 383-90.
- Rudnicki, M. A., P. N. Schnegelsberg, R. H. Stead, T. Braun, H. H. Arnold and R. Jaenisch (1993). "MyoD or Myf-5 is required for the formation of skeletal muscle." *Cell* **75**(7): 1351-9.
- Russell, A. P., M. K. Hesselink, S. K. Lo and P. Schrauwen (2005). "Regulation of metabolic transcriptional co-activators and transcription factors with acute exercise." *Faseb J* **19**(8): 986-8.
- Ryder, J. W., R. Fahlman, H. Wallberg-Henriksson, D. R. Alessi, A. Krook and J. R. Zierath (2000). "Effect of contraction on mitogen-activated protein kinase signal transduction in skeletal muscle. Involvement Of the mitogen- and stress-activated protein kinase 1." *J Biol Chem* **275**(2): 1457-62.

## S.

- Sabourin, L. A., A. Girgis-Gabardo, P. Seale, A. Asakura and M. A. Rudnicki (1999). "Reduced differentiation potential of primary MyoD<sup>-/-</sup> myogenic cells derived from adult skeletal muscle." *J Cell Biol* **144**(4): 631-43.
- Sajan, M. P., M. L. Standaert, S. Nimal, U. Varanasi, T. Pastoor, S. Mastorides, U. Braun, M. Leitges and R. V. Farese (2009a). "The critical role of atypical protein kinase C in activating hepatic SREBP-1c and NFκB in obesity." *J Lipid Res* **50**(6): 1133-45.
- Sajan, M. P., M. L. Standaert, J. Rivas, A. Miura, Y. Kanoh, J. Soto, C. M. Taniguchi, C. R. Kahn and R. V. Farese (2009b). "Role of atypical protein kinase C in activation of sterol regulatory element binding protein-1c and nuclear factor kappa B (NFκappaB) in liver of rodents used as a model of diabetes, and relationships to hyperlipidaemia and insulin resistance." *Diabetologia* **52**(6): 1197-207.
- Sakai, J., E. A. Duncan, R. B. Rawson, X. Hua, M. S. Brown and J. L. Goldstein (1996). "Sterol-regulated release of SREBP-2 from cell membranes requires two sequential cleavages, one within a transmembrane segment." *Cell* **85**(7): 1037-46.
- Sakai, J., A. Nohturfft, D. Cheng, Y. K. Ho, M. S. Brown and J. L. Goldstein (1997). "Identification of complexes between the COOH-terminal domains of sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs) and SREBP cleavage-activating protein." *J Biol Chem* **272**(32): 20213-21.
- Sakai, J., A. Nohturfft, J. L. Goldstein and M. S. Brown (1998). "Cleavage of sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs) at site-1 requires interaction with SREBP cleavage-activating protein. Evidence from in vivo competition studies." *J Biol Chem* **273**(10): 5785-93.
- Sakamoto, K., M. F. Hirshman, W. G. Aschenbach and L. J. Goodyear (2002). "Contraction regulation of Akt in rat skeletal muscle." *J Biol Chem* **277**(14): 11910-7.
- Saltiel, A. R. (2001). "New perspectives into the molecular pathogenesis and treatment of type 2 diabetes." *Cell* **104**(4): 517-29.
- Saltiel, A. R. and C. R. Kahn (2001). "Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism." *Nature* **414**(6865): 799-806.
- Sampaolesi, M., Y. Torrente, A. Innocenzi, R. Tonlorenzi, G. D'Antona, M. A. Pellegrino, R. Barresi, N. Bresolin, M. G. De Angelis, K. P. Campbell, R. Bottinelli and G. Cossu (2003). "Cell therapy of alpha-

- sarcoglycan null dystrophic mice through intra-arterial delivery of mesoangioblasts." Science **301**(5632): 487-92.
- Sanchez, H. B., L. Yieh and T. F. Osborne (1995). "Cooperation by sterol regulatory element-binding protein and Sp1 in sterol regulation of low density lipoprotein receptor gene." J Biol Chem **270**(3): 1161-9.
- Sandberg, M. B., J. Fridriksson, L. Madsen, V. Rishi, C. Vinson, H. Holmsen, R. K. Berge and S. Mandrup (2005). "Glucose-induced lipogenesis in pancreatic beta-cells is dependent on SREBP-1." Mol Cell Endocrinol **240**(1-2): 94-106.
- Sandri, M. (2008). "Signaling in muscle atrophy and hypertrophy." Physiology (Bethesda) **23**: 160-70.
- Sandri, M., C. Sandri, A. Gilbert, C. Skurk, E. Calabria, A. Picard, K. Walsh, S. Schiaffino, S. H. Lecker and A. L. Goldberg (2004). "Foxo transcription factors induce the atrophy-related ubiquitin ligase atrogin-1 and cause skeletal muscle atrophy." Cell **117**(3): 399-412.
- Sapru, M. K., K. M. McCormick and B. Thimmapaya (2002). "High-efficiency adenovirus-mediated in vivo gene transfer into neonatal and adult rodent skeletal muscle." J Neurosci Methods **114**(1): 99-106.
- Sartorelli, V., J. Huang, Y. Hamamori and L. Kedes (1997). "Molecular mechanisms of myogenic coactivation by p300: direct interaction with the activation domain of MyoD and with the MADS box of MEF2C." Mol Cell Biol **17**(2): 1010-26.
- Sassoon, D., G. Lyons, W. E. Wright, V. Lin, A. Lassar, H. Weintraub and M. Buckingham (1989). "Expression of two myogenic regulatory factors myogenin and MyoD1 during mouse embryogenesis." Nature **341**(6240): 303-7.
- Sato, F., T. Kawamoto, K. Fujimoto, M. Noshiro, K. K. Honda, S. Honma, K. Honma and Y. Kato (2004). "Functional analysis of the basic helix-loop-helix transcription factor DEC1 in circadian regulation. Interaction with BMAL1." Eur J Biochem **271**(22): 4409-19.
- Sato, R. (2009). "SREBPs: protein interaction and SREBPs." Febs J **276**(3): 622-7.
- Sato, R., W. Miyamoto, J. Inoue, T. Terada, T. Imanaka and M. Maeda (1999). "Sterol regulatory element-binding protein negatively regulates microsomal triglyceride transfer protein gene transcription." J Biol Chem **274**(35): 24714-20.
- Sato, R., J. Yang, X. Wang, M. J. Evans, Y. K. Ho, J. L. Goldstein and M. S. Brown (1994). "Assignment of the membrane attachment, DNA binding, and transcriptional activation domains of sterol regulatory element-binding protein-1 (SREBP-1)." J Biol Chem **269**(25): 17267-73.
- Schaffer, J. E. (2003). "Lipotoxicity: when tissues overeat." Curr Opin Lipidol **14**(3): 281-7.
- Schiaffino, S., M. Sandri and M. Murgia (2007). "Activity-dependent signaling pathways controlling muscle diversity and plasticity." Physiology (Bethesda) **22**: 269-78.
- Schienda, J., K. A. Engleka, S. Jun, M. S. Hansen, J. A. Epstein, C. J. Tabin, L. M. Kunkel and G. Kardon (2006). "Somitic origin of limb muscle satellite and side population cells." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(4): 945-50.
- Schneider, J. W., W. Gu, L. Zhu, V. Mahdavi and B. Nadal-Ginard (1994). "Reversal of terminal differentiation mediated by p107 in Rb-/- muscle cells." Science **264**(5164): 1467-71.
- Schultz, J. R., H. Tu, A. Luk, J. J. Repa, J. C. Medina, L. Li, S. Schwendner, S. Wang, M. Thoolen, D. J. Mangelsdorf, K. D. Lustig and B. Shan (2000). "Role of LXRs in control of lipogenesis." Genes Dev **14**(22): 2831-8.
- Seimiya, M., R. Bahar, Y. Wang, K. Kawamura, Y. Tada, S. Okada, M. Hatano, T. Tokuhisa, H. Saisho, T. Watanabe, M. Tagawa and O. W. J (2002). "Clast5/Stra13 is a negative regulator of B lymphocyte activation." Biochem Biophys Res Commun **292**(1): 121-7.
- Sellers, W. R. and W. G. Kaelin (1996). "RB [corrected] as a modulator of transcription." Biochim Biophys Acta **1288**(1): M1-5.
- Sever, N., B. L. Song, D. Yabe, J. L. Goldstein, M. S. Brown and R. A. DeBose-Boyd (2003). "Insig-dependent ubiquitination and degradation of mammalian 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase stimulated by sterols and geranylgeraniol." J Biol Chem **278**(52): 52479-90.
- Seward, D. J., J. C. Haney, M. A. Rudnicki and S. J. Swoap (2001). "bHLH transcription factor MyoD affects myosin heavy chain expression pattern in a muscle-specific fashion." Am J Physiol Cell Physiol **280**(2): C408-13.
- Sewter, C., D. Berger, R. V. Considine, G. Medina, J. Rochford, T. Ciaraldi, R. Henry, L. Dohm, J. S. Flier, S. O'Rahilly and A. J. Vidal-Puig (2002). "Human obesity and type 2 diabetes are associated with alterations in SREBP1 isoform expression that are reproduced ex vivo by tumor necrosis factor-alpha." Diabetes **51**(4): 1035-41.
- Shack, S., M. Gorospe, T. W. Fawcett, W. R. Hudgins and N. J. Holbrook (1999). "Activation of the cholesterol pathway and Ras maturation in response to stress." Oncogene **18**(44): 6021-8.
- Shea-Eaton, W., D. Lopez and M. P. McLean (2001). "Yin yang 1 protein negatively regulates high-density lipoprotein receptor gene transcription by disrupting binding of sterol regulatory element binding protein to the sterol regulatory element." Endocrinology **142**(1): 49-58.

- Shen, M., T. Kawamoto, W. Yan, K. Nakamasu, M. Tamagami, Y. Koyano, M. Noshiro and Y. Kato (1997). "Molecular characterization of the novel basic helix-loop-helix protein DEC1 expressed in differentiated human embryo chondrocytes." *Biochem Biophys Res Commun* **236**(2): 294-8.
- Shen, M., E. Yoshida, W. Yan, T. Kawamoto, K. Suardita, Y. Koyano, K. Fujimoto, M. Noshiro and Y. Kato (2002). "Basic helix-loop-helix protein DEC1 promotes chondrocyte differentiation at the early and terminal stages." *J Biol Chem* **277**(51): 50112-20.
- Sherr, C. J. (1995). "D-type cyclins." *Trends Biochem Sci* **20**(5): 187-90.
- Sherwood, R. I., J. L. Christensen, I. M. Conboy, M. J. Conboy, T. A. Rando, I. L. Weissman and A. J. Wagers (2004a). "Isolation of adult mouse myogenic progenitors: functional heterogeneity of cells within and engrafting skeletal muscle." *Cell* **119**(4): 543-54.
- Sherwood, R. I., J. L. Christensen, I. L. Weissman and A. J. Wagers (2004b). "Determinants of skeletal muscle contributions from circulating cells, bone marrow cells, and hematopoietic stem cells." *Stem Cells* **22**(7): 1292-304.
- Shimano, H. (2001). "Sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs): transcriptional regulators of lipid synthetic genes." *Prog Lipid Res* **40**(6): 439-52.
- Shimano, H. (2009). "SREBPs: physiology and pathophysiology of the SREBP family." *Febs J* **276**(3): 616-21.
- Shimano, H., J. D. Horton, R. E. Hammer, I. Shimomura, M. S. Brown and J. L. Goldstein (1996). "Overproduction of cholesterol and fatty acids causes massive liver enlargement in transgenic mice expressing truncated SREBP-1a." *J Clin Invest* **98**(7): 1575-84.
- Shimano, H., J. D. Horton, I. Shimomura, R. E. Hammer, M. S. Brown and J. L. Goldstein (1997a). "Isoform 1c of sterol regulatory element binding protein is less active than isoform 1a in livers of transgenic mice and in cultured cells." *J Clin Invest* **99**(5): 846-54.
- Shimano, H., I. Shimomura, R. E. Hammer, J. Herz, J. L. Goldstein, M. S. Brown and J. D. Horton (1997b). "Elevated levels of SREBP-2 and cholesterol synthesis in livers of mice homozygous for a targeted disruption of the SREBP-1 gene." *J Clin Invest* **100**(8): 2115-24.
- Shimano, H., N. Yahagi, M. Amemiya-Kudo, A. H. Hasty, J. Osuga, Y. Tamura, F. Shionoiri, Y. Iizuka, K. Ohashi, K. Harada, T. Gotoda, S. Ishibashi and N. Yamada (1999). "Sterol regulatory element-binding protein-1 as a key transcription factor for nutritional induction of lipogenic enzyme genes." *J Biol Chem* **274**(50): 35832-9.
- Shimomura, I., Y. Bashmakov, S. Ikemoto, J. D. Horton, M. S. Brown and J. L. Goldstein (1999). "Insulin selectively increases SREBP-1c mRNA in the livers of rats with streptozotocin-induced diabetes." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(24): 13656-61.
- Shimomura, I., R. E. Hammer, J. A. Richardson, S. Ikemoto, Y. Bashmakov, J. L. Goldstein and M. S. Brown (1998). "Insulin resistance and diabetes mellitus in transgenic mice expressing nuclear SREBP-1c in adipose tissue: model for congenital generalized lipodystrophy." *Genes Dev* **12**(20): 3182-94.
- Shimomura, I., H. Shimano, J. D. Horton, J. L. Goldstein and M. S. Brown (1997). "Differential expression of exons 1a and 1c in mRNAs for sterol regulatory element binding protein-1 in human and mouse organs and cultured cells." *J Clin Invest* **99**(5): 838-45.
- Shin, E. K., A. Shin, C. Paulding, B. Schaffhausen and A. S. Yee (1995). "Multiple change in E2F function and regulation occur upon muscle differentiation." *Mol Cell Biol* **15**(4): 2252-62.
- Shirakata, M., F. K. Friedman, Q. Wei and B. M. Paterson (1993). "Dimerization specificity of myogenic helix-loop-helix DNA-binding factors directed by nonconserved hydrophilic residues." *Genes Dev* **7**(12A): 2456-70.
- Shore, P. and A. D. Sharrocks (1995). "The MADS-box family of transcription factors." *Eur J Biochem* **229**(1): 1-13.
- Simone, C., S. V. Forcales, D. A. Hill, A. N. Imbalzano, L. Latella and P. L. Puri (2004). "p38 pathway targets SWI-SNF chromatin-remodeling complex to muscle-specific loci." *Nat Genet* **36**(7): 738-43.
- Singleton, J. R. and E. L. Feldman (2001). "Insulin-like growth factor-I in muscle metabolism and myotherapies." *Neurobiol Dis* **8**(4): 541-54.
- Siu, P. M., D. A. Donley, R. W. Bryner and S. E. Alway (2004). "Myogenin and oxidative enzyme gene expression levels are elevated in rat soleus muscles after endurance training." *J Appl Physiol* **97**(1): 277-85.
- Skapek, S. X., J. Rhee, P. S. Kim, B. G. Novitch and A. B. Lassar (1996). "Cyclin-mediated inhibition of muscle gene expression via a mechanism that is independent of pRB hyperphosphorylation." *Mol Cell Biol* **16**(12): 7043-53.
- Skapek, S. X., J. Rhee, D. B. Spicer and A. B. Lassar (1995). "Inhibition of myogenic differentiation in proliferating myoblasts by cyclin D1-dependent kinase." *Science* **267**(5200): 1022-4.
- Slack, J. M. and D. Tosh (2001). "Transdifferentiation and metaplasia--switching cell types." *Curr Opin Genet Dev* **11**(5): 581-6.
- Smialowski, P., M. Singh, A. Mikolajka, S. Majumdar, J. K. Joy, N. Nalabothula, M. Krajewski, R. Degenkolbe, H. U. Bernard and T. A. Holak (2005). "NMR and mass spectrometry studies of putative interactions of

- cell cycle proteins pRb and CDK6 with cell differentiation proteins MyoD and ID-2." Biochim Biophys Acta **1750**(1): 48-60.
- Smith, I. J., K. M. Huffman, M. T. Durham, B. D. Duscha and W. E. Kraus (2009). "Sex-specific alterations in mRNA level of key lipid metabolism enzymes in skeletal muscle of overweight and obese subjects following endurance exercise." Physiol Genomics **36**(3): 149-57.
- Smith, J. R., T. F. Osborne, J. L. Goldstein and M. S. Brown (1990). "Identification of nucleotides responsible for enhancer activity of sterol regulatory element in low density lipoprotein receptor gene." J Biol Chem **265**(4): 2306-10.
- Song, A., Q. Wang, M. G. Goebel and M. A. Harrington (1998). "Phosphorylation of nuclear MyoD is required for its rapid degradation." Mol Cell Biol **18**(9): 4994-9.
- Soukas, A., P. Cohen, N. D. Succi and J. M. Friedman (2000). "Leptin-specific patterns of gene expression in white adipose tissue." Genes Dev **14**(8): 963-80.
- Spicer, D. B., J. Rhee, W. L. Cheung and A. B. Lassar (1996). "Inhibition of myogenic bHLH and MEF2 transcription factors by the bHLH protein Twist." Science **272**(5267): 1476-80.
- Spiegelman, B. M., E. Hu, J. B. Kim and R. Brun (1997). "PPAR gamma and the control of adipogenesis." Biochimie **79**(2-3): 111-2.
- Spitz, F., J. Demignon, A. Porteu, A. Kahn, J. P. Concordet, D. Daegelen and P. Maire (1998). "Expression of myogenin during embryogenesis is controlled by Six/sine oculis homeoproteins through a conserved MEF3 binding site." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(24): 14220-5.
- Spizz, G., D. Roman, A. Strauss and E. N. Olson (1986). "Serum and fibroblast growth factor inhibit myogenic differentiation through a mechanism dependent on protein synthesis and independent of cell proliferation." J Biol Chem **261**(20): 9483-8.
- St-Pierre, B., G. Flock, E. Zacksenhaus and S. E. Egan (2002). "Stra13 homodimers repress transcription through class B E-box elements." J Biol Chem **277**(48): 46544-51.
- Starling, R. D., T. A. Trappe, A. C. Parcell, C. G. Kerr, W. J. Fink and D. L. Costill (1997). "Effects of diet on muscle triglyceride and endurance performance." J Appl Physiol **82**(4): 1185-9.
- Stenholm, S., T. B. Harris, T. Rantanen, M. Visser, S. B. Kritchevsky and L. Ferrucci (2008). "Sarcopenic obesity: definition, cause and consequences." Curr Opin Clin Nutr Metab Care **11**(6): 693-700.
- Stevenson, E. J., P. G. Giresi, A. Koncarevic and S. C. Kandarian (2003). "Global analysis of gene expression patterns during disuse atrophy in rat skeletal muscle." J Physiol **551**(Pt 1): 33-48.
- Stewart, C. E. and J. Rittweger (2006). "Adaptive processes in skeletal muscle: molecular regulators and genetic influences." J Musculoskelet Neuronal Interact **6**(1): 73-86.
- Stitt, T. N., D. Drujan, B. A. Clarke, F. Panaro, Y. Timofeyeva, W. O. Kline, M. Gonzalez, G. D. Yancopoulos and D. J. Glass (2004). "The IGF-1/PI3K/Akt pathway prevents expression of muscle atrophy-induced ubiquitin ligases by inhibiting FOXO transcription factors." Mol Cell **14**(3): 395-403.
- Stockdale, F. E. (1992). "Myogenic cell lineages." Dev Biol **154**(2): 284-98.
- Summerbell, D., P. R. Ashby, O. Coutelle, D. Cox, S. Yee and P. W. Rigby (2000). "The expression of Myf5 in the developing mouse embryo is controlled by discrete and dispersed enhancers specific for particular populations of skeletal muscle precursors." Development **127**(17): 3745-57.
- Sun, H., L. Li, C. Vercherat, N. T. Gulbagci, S. Acharjee, J. Li, T. K. Chung, T. H. Thin and R. Taneja (2007a). "Stra13 regulates satellite cell activation by antagonizing Notch signaling." J Cell Biol **177**(4): 647-57.
- Sun, H., B. Lu, R. Q. Li, R. A. Flavell and R. Taneja (2001). "Defective T cell activation and autoimmune disorder in Stra13-deficient mice." Nat Immunol **2**(11): 1040-7.
- Sun, H. and R. Taneja (2000). "Stra13 expression is associated with growth arrest and represses transcription through histone deacetylase (HDAC)-dependent and HDAC-independent mechanisms." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(8): 4058-63.
- Sun, L., N. Halaihel, W. Zhang, T. Rogers and M. Levi (2002). "Role of sterol regulatory element-binding protein 1 in regulation of renal lipid metabolism and glomerulosclerosis in diabetes mellitus." J Biol Chem **277**(21): 18919-27.
- Sun, L. P., L. Li, J. L. Goldstein and M. S. Brown (2005). "Insig required for sterol-mediated inhibition of Scap/SREBP binding to COPII proteins in vitro." J Biol Chem **280**(28): 26483-90.
- Sun, L. P., J. Seemann, J. L. Goldstein and M. S. Brown (2007b). "Sterol-regulated transport of SREBPs from endoplasmic reticulum to Golgi: Insig renders sorting signal in Scap inaccessible to COPII proteins." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(16): 6519-26.

## T.

- Tajbakhsh, S., U. Borello, E. Vivarelli, R. Kelly, J. Papkoff, D. Duprez, M. Buckingham and G. Cossu (1998). "Differential activation of Myf5 and MyoD by different Wnts in explants of mouse paraxial mesoderm and the later activation of myogenesis in the absence of Myf5." *Development* **125**(21): 4155-62.
- Tajbakhsh, S., D. Rocancourt, G. Cossu and M. Buckingham (1997). "Redefining the genetic hierarchies controlling skeletal myogenesis: Pax-3 and Myf-5 act upstream of MyoD." *Cell* **89**(1): 127-38.
- Takahashi, A., H. Shimano, Y. Nakagawa, T. Yamamoto, K. Motomura, T. Matsuzaka, H. Sone, H. Suzuki, H. Toyoshima and N. Yamada (2005). "Transgenic mice overexpressing SREBP-1a under the control of the PEPCK promoter exhibit insulin resistance, but not diabetes." *Biochim Biophys Acta* **1740**(3): 427-33.
- Tapscott, S. J. (2005). "The circuitry of a master switch: MyoD and the regulation of skeletal muscle gene transcription." *Development* **132**(12): 2685-95.
- Tatsumi, R., J. E. Anderson, C. J. Nevoret, O. Halevy and R. E. Allen (1998). "HGF/SF is present in normal adult skeletal muscle and is capable of activating satellite cells." *Dev Biol* **194**(1): 114-28.
- Teboul, L., D. Gaillard, L. Staccini, H. Inadera, E. Z. Amri and P. A. Grimaldi (1995). "Thiazolidinediones and fatty acids convert myogenic cells into adipose-like cells." *J Biol Chem* **270**(47): 28183-7.
- Teramoto, M., K. Nakamasu, M. Noshiro, Y. Matsuda, O. Gotoh, M. Shen, S. Tsutsumi, T. Kawamoto, Y. Iwamoto and Y. Kato (2001). "Gene structure and chromosomal location of a human bHLH transcriptional factor DEC1 x Stra13 x SHARP-2/BHLHB2." *J Biochem* **129**(3): 391-6.
- Thewke, D. P., S. R. Panini and M. Sinensky (1998). "Oleate potentiates oxysterol inhibition of transcription from sterol regulatory element-1-regulated promoters and maturation of sterol regulatory element-binding proteins." *J Biol Chem* **273**(33): 21402-7.
- Thompson, W. R., B. Nadal-Ginard and V. Mahdavi (1991). "A MyoD1-independent muscle-specific enhancer controls the expression of the beta-myosin heavy chain gene in skeletal and cardiac muscle cells." *J Biol Chem* **266**(33): 22678-88.
- Thomson, S., A. L. Clayton, C. A. Hazzalin, S. Rose, M. J. Barratt and L. C. Mahadevan (1999). "The nucleosomal response associated with immediate-early gene induction is mediated via alternative MAP kinase cascades: MSK1 as a potential histone H3/HMG-14 kinase." *Embo J* **18**(17): 4779-93.
- Tisdale, M. J. (2008). "Catabolic mediators of cancer cachexia." *Curr Opin Support Palliat Care* **2**(4): 256-61.
- Tontonoz, P., J. B. Kim, R. A. Graves and B. M. Spiegelman (1993). "ADD1: a novel helix-loop-helix transcription factor associated with adipocyte determination and differentiation." *Mol Cell Biol* **13**(8): 4753-9.
- Toth, J. I., S. Datta, J. N. Athanikar, L. P. Freedman and T. F. Osborne (2004). "Selective coactivator interactions in gene activation by SREBP-1a and -1c." *Mol Cell Biol* **24**(18): 8288-300.
- Towle, H. C. (1995). "Metabolic regulation of gene transcription in mammals." *J Biol Chem* **270**(40): 23235-8.
- Towle, H. C., E. N. Kaytor and H. M. Shih (1997). "Regulation of the expression of lipogenic enzyme genes by carbohydrate." *Annu Rev Nutr* **17**: 405-33.
- Treebak, J. T. and J. F. Wojtaszewski (2008). "Role of 5'AMP-activated protein kinase in skeletal muscle." *Int J Obes (Lond)* **32 Suppl 4**: S13-7.
- Tsintzas, K., K. Jewell, M. Kamran, D. Laithwaite, T. Boonsong, J. Littlewood, I. Macdonald and A. Bennett (2006). "Differential regulation of metabolic genes in skeletal muscle during starvation and refeeding in humans." *J Physiol* **575**(Pt 1): 291-303.
- Tunstall, R. J., K. A. Mehan, M. Hargreaves, L. L. Spriet and D. Cameron-Smith (2002a). "Fasting activates the gene expression of UCP3 independent of genes necessary for lipid transport and oxidation in skeletal muscle." *Biochem Biophys Res Commun* **294**(2): 301-8.
- Tunstall, R. J., K. A. Mehan, G. D. Wadley, G. R. Collier, A. Bonen, M. Hargreaves and D. Cameron-Smith (2002b). "Exercise training increases lipid metabolism gene expression in human skeletal muscle." *Am J Physiol Endocrinol Metab* **283**(1): E66-72.
- Turcotte, L. P. and J. S. Fisher (2008). "Skeletal muscle insulin resistance: roles of fatty acid metabolism and exercise." *Phys Ther* **88**(11): 1279-96.
- Turley, H., C. C. Wykoff, S. Troup, P. H. Watson, K. C. Gatter and A. L. Harris (2004). "The hypoxia-regulated transcription factor DEC1 (Stra13, SHARP-2) and its expression in human tissues and tumours." *J Pathol* **203**(3): 808-13.

## U.

- Ustanina, S., J. Carvajal, P. Rigby and T. Braun (2007). "The myogenic factor Myf5 supports efficient skeletal muscle regeneration by enabling transient myoblast amplification." *Stem Cells* **25**(8): 2006-16.

## V.

- Valdez, M. R., J. A. Richardson, W. H. Klein and E. N. Olson (2000). "Failure of Myf5 to support myogenic differentiation without myogenin, MyoD, and MRF4." *Dev Biol* **219**(2): 287-98.
- Van Swearingen, J. and C. Lance-Jones (1995). "Slow and fast muscle fibers are preferentially derived from myoblasts migrating into the chick limb bud at different developmental times." *Dev Biol* **170**(2): 321-37.
- Vary, T. C. and C. J. Lynch (2006). "Meal feeding enhances formation of eIF4F in skeletal muscle: role of increased eIF4E availability and eIF4G phosphorylation." *Am J Physiol Endocrinol Metab* **290**(4): E631-42.
- Vasyutina, E., D. C. Lenhard and C. Birchmeier (2007). "Notch function in myogenesis." *Cell Cycle* **6**(12): 1451-4.
- Velloso, C. P. (2008). "Regulation of muscle mass by growth hormone and IGF-I." *Br J Pharmacol* **154**(3): 557-68.
- Venuti, J. M., L. Gan, M. T. Kozłowski and W. H. Klein (1993). "Developmental potential of muscle cell progenitors and the myogenic factor SUM-1 in the sea urchin embryo." *Mech Dev* **41**(1): 3-14.
- Vestergaard, H., C. Bjarbaek, T. Hansen, F. S. Larsen, D. K. Granner and O. Pedersen (1995). "Impaired activity and gene expression of hexokinase II in muscle from non-insulin-dependent diabetes mellitus patients." *J Clin Invest* **96**(6): 2639-45.
- Vestergaard, H., S. Lund, F. S. Larsen, O. J. Bjerrum and O. Pedersen (1993). "Glycogen synthase and phosphofructokinase protein and mRNA levels in skeletal muscle from insulin-resistant patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus." *J Clin Invest* **91**(6): 2342-50.
- Vieira, E., E. C. Nilsson, A. Nerstedt, M. Ormestad, Y. C. Long, P. M. Garcia-Roves, J. R. Zierath and M. Mahlapuu (2008). "Relationship between AMPK and the transcriptional balance of clock-related genes in skeletal muscle." *Am J Physiol Endocrinol Metab* **295**(5): E1032-7.
- Voytik, S. L., M. Przyborski, S. F. Badylak and S. F. Konieczny (1993). "Differential expression of muscle regulatory factor genes in normal and denervated adult rat hindlimb muscles." *Dev Dyn* **198**(3): 214-24.

## W.

- Walsh, K. and H. Perlman (1997). "Cell cycle exit upon myogenic differentiation." *Curr Opin Genet Dev* **7**(5): 597-602.
- Walters, E. H., N. C. Stickland and P. T. Loughna (2000a). "The expression of the myogenic regulatory factors in denervated and normal muscles of different phenotypes." *J Muscle Res Cell Motil* **21**(7): 647-53.
- Walters, E. H., N. C. Stickland and P. T. Loughna (2000b). "MRF-4 exhibits fiber type- and muscle-specific pattern of expression in postnatal rat muscle." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **278**(5): R1381-4.
- Wang, J., K. Helin, P. Jin and B. Nadal-Ginard (1995a). "Inhibition of in vitro myogenic differentiation by cellular transcription factor E2F1." *Cell Growth Differ* **6**(10): 1299-306.
- Wang, J., Q. Huang, W. Tang and B. Nadal-Ginard (1996a). "E2F1 inhibition of transcription activation by myogenic basic helix-loop-helix regulators." *J Cell Biochem* **62**(3): 405-10.
- Wang, X., M. R. Briggs, X. Hua, C. Yokoyama, J. L. Goldstein and M. S. Brown (1993). "Nuclear protein that binds sterol regulatory element of low density lipoprotein receptor promoter. II. Purification and characterization." *J Biol Chem* **268**(19): 14497-504.
- Wang, X., Z. Hu, J. Hu, J. Du and W. E. Mitch (2006). "Insulin resistance accelerates muscle protein degradation: Activation of the ubiquitin-proteasome pathway by defects in muscle cell signaling." *Endocrinology* **147**(9): 4160-8.
- Wang, X., J. T. Pai, E. A. Wiedenfeld, J. C. Medina, C. A. Slaughter, J. L. Goldstein and M. S. Brown (1995b). "Purification of an interleukin-1 beta converting enzyme-related cysteine protease that cleaves sterol regulatory element-binding proteins between the leucine zipper and transmembrane domains." *J Biol Chem* **270**(30): 18044-50.
- Wang, X., R. Sato, M. S. Brown, X. Hua and J. L. Goldstein (1994). "SREBP-1, a membrane-bound transcription factor released by sterol-regulated proteolysis." *Cell* **77**(1): 53-62.
- Wang, X., N. G. Zelenski, J. Yang, J. Sakai, M. S. Brown and J. L. Goldstein (1996b). "Cleavage of sterol regulatory element binding proteins (SREBPs) by CPP32 during apoptosis." *Embo J* **15**(5): 1012-20.
- Wei, Q. and B. M. Paterson (2001). "Regulation of MyoD function in the dividing myoblast." *FEBS Lett* **490**(3): 171-8.
- Weintraub, H. (1993). "The MyoD family and myogenesis: redundancy, networks, and thresholds." *Cell* **75**(7): 1241-4.

- Weintraub, H., V. J. Dwarki, I. Verma, R. Davis, S. Hollenberg, L. Snider, A. Lassar and S. J. Tapscott (1991). "Muscle-specific transcriptional activation by MyoD." Genes Dev **5**(8): 1377-86.
- Weintraub, H., T. Genetta and T. Kadesch (1994). "Tissue-specific gene activation by MyoD: determination of specificity by cis-acting repression elements." Genes Dev **8**(18): 2203-11.
- Weis, J. (1994). "Jun, Fos, MyoD1, and myogenin proteins are increased in skeletal muscle fiber nuclei after denervation." Acta Neuropathol **87**(1): 63-70.
- Wentworth, B. M., M. Donoghue, J. C. Engert, E. B. Berglund and N. Rosenthal (1991). "Paired MyoD-binding sites regulate myosin light chain gene expression." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(4): 1242-6.
- Widegren, U., X. J. Jiang, A. Krook, A. V. Chibalin, M. Bjornholm, M. Tally, R. A. Roth, J. Henriksson, H. Wallberg-henriksson and J. R. Zierath (1998). "Divergent effects of exercise on metabolic and mitogenic signaling pathways in human skeletal muscle." Faseb J **12**(13): 1379-89.
- Wigler, M., R. Sweet, G. K. Sim, B. Wold, A. Pellicer, E. Lacy, T. Maniatis, S. Silverstein and R. Axel (1979). "Transformation of mammalian cells with genes from procaryotes and eucaryotes." Cell **16**(4): 777-85.
- Wong, M. W., M. Pisegna, M. F. Lu, D. Leibham and M. Perry (1994). "Activation of Xenopus MyoD transcription by members of the MEF2 protein family." Dev Biol **166**(2): 683-95.
- Worgall, T. S., S. L. Sturley, T. Seo, T. F. Osborne and R. J. Deckelbaum (1998). "Polyunsaturated fatty acids decrease expression of promoters with sterol regulatory elements by decreasing levels of mature sterol regulatory element-binding protein." J Biol Chem **273**(40): 25537-40.
- Wozniak, A. C. and J. E. Anderson (2007). "Nitric oxide-dependence of satellite stem cell activation and quiescence on normal skeletal muscle fibers." Dev Dyn **236**(1): 240-50.
- Wretman, C., A. Lionikas, U. Widegren, J. Lannergren, H. Westerblad and J. Henriksson (2001). "Effects of concentric and eccentric contractions on phosphorylation of MAPK(erk1/2) and MAPK(p38) in isolated rat skeletal muscle." J Physiol **535**(Pt 1): 155-64.
- Wu, X., J. Wang, X. Cui, L. Maianu, B. Rhees, J. Rosinski, W. V. So, S. M. Willi, M. V. Osier, H. S. Hill, G. P. Page, D. B. Allison, M. Martin and W. T. Garvey (2007). "The effect of insulin on expression of genes and biochemical pathways in human skeletal muscle." Endocrine **31**(1): 5-17.

## X.

- Xiong, S., S. S. Chirala and S. J. Wakil (2000). "Sterol regulation of human fatty acid synthase promoter I requires nuclear factor-Y- and Sp-1-binding sites." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(8): 3948-53.
- Xu, J., H. Cho, S. O'Malley, J. H. Park and S. D. Clarke (2002). "Dietary polyunsaturated fats regulate rat liver sterol regulatory element binding proteins-1 and -2 in three distinct stages and by different mechanisms." J Nutr **132**(11): 3333-9.

## Y.

- Yabe, D., M. S. Brown and J. L. Goldstein (2002). "Insig-2, a second endoplasmic reticulum protein that binds SCAP and blocks export of sterol regulatory element-binding proteins." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(20): 12753-8.
- Yabe, D., R. Komuro, G. Liang, J. L. Goldstein and M. S. Brown (2003). "Liver-specific mRNA for Insig-2 down-regulated by insulin: implications for fatty acid synthesis." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(6): 3155-60.
- Yablonka-Reuveni, Z., M. A. Rudnicki, A. J. Rivera, M. Primig, J. E. Anderson and P. Natanson (1999). "The transition from proliferation to differentiation is delayed in satellite cells from mice lacking MyoD." Dev Biol **210**(2): 440-55.
- Yahagi, N., H. Shimano, A. H. Hasty, M. Amemiya-Kudo, H. Okazaki, Y. Tamura, Y. Iizuka, F. Shionoiri, K. Ohashi, J. Osuga, K. Harada, T. Gotoda, R. Nagai, S. Ishibashi and N. Yamada (1999). "A crucial role of sterol regulatory element-binding protein-1 in the regulation of lipogenic gene expression by polyunsaturated fatty acids." J Biol Chem **274**(50): 35840-4.
- Yamada, K., H. Kawata, Z. Shou, T. Mizutani, T. Noguchi and K. Miyamoto (2003). "Insulin induces the expression of the SHARP-2/Stra13/DEC1 gene via a phosphoinositide 3-kinase pathway." J Biol Chem **278**(33): 30719-24.
- Yamada, K. and K. Miyamoto (2005). "Basic helix-loop-helix transcription factors, BHLHB2 and BHLHB3; their gene expressions are regulated by multiple extracellular stimuli." Front Biosci **10**: 3151-71.
- Yamada, K., H. Ogata-Kawata, K. Matsuura and K. Miyamoto (2005). "SHARP-2/Stra13/DEC1 as a potential repressor of phosphoenolpyruvate carboxykinase gene expression." FEBS Lett **579**(6): 1509-14.
- Yang, J., J. L. Goldstein, R. E. Hammer, Y. A. Moon, M. S. Brown and J. D. Horton (2001). "Decreased lipid synthesis in livers of mice with disrupted Site-1 protease gene." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(24): 13607-12.



- Yang, S. H., A. Galanis and A. D. Sharrocks (1999). "Targeting of p38 mitogen-activated protein kinases to MEF2 transcription factors." *Mol Cell Biol* **19**(6): 4028-38.
- Yang, T., P. J. Espenshade, M. E. Wright, D. Yabe, Y. Gong, R. Aebersold, J. L. Goldstein and M. S. Brown (2002). "Crucial step in cholesterol homeostasis: sterols promote binding of SCAP to INSIG-1, a membrane protein that facilitates retention of SREBPs in ER." *Cell* **110**(4): 489-500.
- Yang, T., J. L. Goldstein and M. S. Brown (2000). "Overexpression of membrane domain of SCAP prevents sterols from inhibiting SCAP.SREBP exit from endoplasmic reticulum." *J Biol Chem* **275**(38): 29881-6.
- Yang, Y., A. Creer, B. Jemiolo and S. Trappe (2005). "Time course of myogenic and metabolic gene expression in response to acute exercise in human skeletal muscle." *J Appl Physiol* **98**(5): 1745-52.
- Yeh, M., A. L. Cole, J. Choi, Y. Liu, D. Tulchinsky, J. H. Qiao, M. C. Fishbein, A. N. Dooley, T. Hovnanian, K. Mouilleseaux, D. K. Vora, W. P. Yang, P. Gargalovic, T. Kirchgessner, J. Y. Shyy and J. A. Berliner (2004). "Role for sterol regulatory element-binding protein in activation of endothelial cells by phospholipid oxidation products." *Circ Res* **95**(8): 780-8.
- Yellaturu, C. R., X. Deng, L. M. Cagen, H. G. Wilcox, C. M. Mansbach, 2nd, S. A. Siddiqi, E. A. Park, R. Raghov and M. B. Elam (2009). "Insulin Enhances Post-translational Processing of Nascent SREBP-1c by Promoting Its Phosphorylation and Association with COPII Vesicles." *J Biol Chem* **284**(12): 7518-32.
- Yieh, L., H. B. Sanchez and T. F. Osborne (1995). "Domains of transcription factor Sp1 required for synergistic activation with sterol regulatory element binding protein 1 of low density lipoprotein receptor promoter." *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(13): 6102-6.
- Yokota, Y. and S. Mori (2002). "Role of Id family proteins in growth control." *J Cell Physiol* **190**(1): 21-8.
- Yokoyama, C., X. Wang, M. R. Briggs, A. Admon, J. Wu, X. Hua, J. L. Goldstein and M. S. Brown (1993). "SREBP-1, a basic-helix-loop-helix-leucine zipper protein that controls transcription of the low density lipoprotein receptor gene." *Cell* **75**(1): 187-97.
- Yoon, D. Y., P. Buchler, S. T. Saarikoski, O. J. Hines, H. A. Reber and O. Hankinson (2001). "Identification of genes differentially induced by hypoxia in pancreatic cancer cells." *Biochem Biophys Res Commun* **288**(4): 882-6.
- Yoon, J. K., E. N. Olson, H. H. Arnold and B. J. Wold (1997). "Different MRF4 knockout alleles differentially disrupt Myf-5 expression: cis-regulatory interactions at the MRF4/Myf-5 locus." *Dev Biol* **188**(2): 349-62.
- Yoshikawa, T., H. Shimano, M. Amemiya-Kudo, N. Yahagi, A. H. Hasty, T. Matsuzaka, H. Okazaki, Y. Tamura, Y. Iizuka, K. Ohashi, J. Osuga, K. Harada, T. Gotoda, S. Kimura, S. Ishibashi and N. Yamada (2001). "Identification of liver X receptor-retinoid X receptor as an activator of the sterol regulatory element-binding protein 1c gene promoter." *Mol Cell Biol* **21**(9): 2991-3000.
- Young, T., M. Palta, J. Dempsey, J. Skatrud, S. Weber and S. Badr (1993). "The occurrence of sleep-disordered breathing among middle-aged adults." *N Engl J Med* **328**(17): 1230-5.
- Yu, C., Y. Chen, G. W. Cline, D. Zhang, H. Zong, Y. Wang, R. Bergeron, J. K. Kim, S. W. Cushman, G. J. Cooney, B. Atcheson, M. F. White, E. W. Kraegen and G. I. Shulman (2002). "Mechanism by which fatty acids inhibit insulin activation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1)-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity in muscle." *J Biol Chem* **277**(52): 50230-6.
- Yu, M., E. Blomstrand, A. V. Chibalin, A. Krook and J. R. Zierath (2001). "Marathon running increases ERK1/2 and p38 MAP kinase signalling to downstream targets in human skeletal muscle." *J Physiol* **536**(Pt 1): 273-82.
- Yu, M., N. K. Stepto, A. V. Chibalin, L. G. Fryer, D. Carling, A. Krook, J. A. Hawley and J. R. Zierath (2003). "Metabolic and mitogenic signal transduction in human skeletal muscle after intense cycling exercise." *J Physiol* **546**(Pt 2): 327-35.
- Yuan, W., G. Condorelli, M. Caruso, A. Felsani and A. Giordano (1996). "Human p300 protein is a coactivator for the transcription factor MyoD." *J Biol Chem* **271**(15): 9009-13.
- Yun, Z., H. L. Maecker, R. S. Johnson and A. J. Giaccia (2002). "Inhibition of PPAR gamma 2 gene expression by the HIF-1-regulated gene DEC1/Stra13: a mechanism for regulation of adipogenesis by hypoxia." *Dev Cell* **2**(3): 331-41.
- Yunokawa, M., K. Tanimoto, H. Nakamura, N. Nagai, Y. Kudo, T. Kawamoto, Y. Kato, E. Hiyama, K. Hiyama and M. Nishiyama (2007). "Differential regulation of DEC2 among hypoxia-inducible genes in endometrial carcinomas." *Oncol Rep* **17**(4): 871-8.

## Z.

- Zabludoff, S. D., M. Csete, R. Wagner, X. Yu and B. J. Wold (1998). "p27Kip1 is expressed transiently in developing myotomes and enhances myogenesis." *Cell Growth Differ* **9**(1): 1-11.
- Zamboni, M., G. Mazzali, F. Fantin, A. Rossi and V. Di Francesco (2008). "Sarcopenic obesity: a new category of obesity in the elderly." *Nutr Metab Cardiovasc Dis* **18**(5): 388-95.
- Zawel, L., J. Yu, C. J. Torrance, S. Markowitz, K. W. Kinzler, B. Vogelstein and S. Zhou (2002). "DEC1 is a downstream target of TGF-beta with sequence-specific transcriptional repressor activities." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(5): 2848-53.
- Zetser, A., E. Gredinger and E. Bengal (1999). "p38 mitogen-activated protein kinase pathway promotes skeletal muscle differentiation. Participation of the Mef2c transcription factor." *J Biol Chem* **274**(8): 5193-200.
- Zhang, H. S., M. Gavin, A. Dahiya, A. A. Postigo, D. Ma, R. X. Luo, J. W. Harbour and D. C. Dean (2000). "Exit from G1 and S phase of the cell cycle is regulated by repressor complexes containing HDAC-Rb-hSWI/SNF and Rb-hSWI/SNF." *Cell* **101**(1): 79-89.
- Zhang, J. M., Q. Wei, X. Zhao and B. M. Paterson (1999). "Coupling of the cell cycle and myogenesis through the cyclin D1-dependent interaction of MyoD with cdk4." *Embo J* **18**(4): 926-33.
- Zhang, W., R. R. Behringer and E. N. Olson (1995). "Inactivation of the myogenic bHLH gene MRF4 results in up-regulation of myogenin and rib anomalies." *Genes Dev* **9**(11): 1388-99.
- Zhao, M., L. New, V. V. Kravchenko, Y. Kato, H. Gram, F. di Padova, E. N. Olson, R. J. Ulevitch and J. Han (1999). "Regulation of the MEF2 family of transcription factors by p38." *Mol Cell Biol* **19**(1): 21-30.
- Zierath, J. R. and J. A. Hawley (2004). "Skeletal muscle fiber type: influence on contractile and metabolic properties." *PLoS Biol* **2**(10): e348.
- Zingg, J. M., G. Pedraza-Alva and J. P. Jost (1994). "MyoD1 promoter autoregulation is mediated by two proximal E-boxes." *Nucleic Acids Res* **22**(12): 2234-41.

