

UNIVERSITE PARIS V - RENE DESCARTES

THESE

En vue de l'obtention du grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PARIS DESCARTES

Discipline : Biologie cellulaire

Ecole doctorale : Gc2iD

Présentée et soutenue publiquement par

Laura Collard

Le 30 octobre 2013

**Rôle du facteur de transcription Srf au cours de
l'atrophie du muscle squelettique et dans les cellules
satellites**

Directrice de thèse : Dr. Athanassia Sotiropoulos

Jury

Pr. Christophe Chanoine

Dr. Helge Amthor

Dr. Frédéric Relaix

Dr. Gisèle Bonne

Dr. Dario Coletti

Président du jury

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examineur

Table des matières

INTRODUCTION.....	9
I. Muscle squelettique.....	10
1. Muscle squelettique adulte	10
a. Anatomie	10
b. Système contractile.....	11
c. Contraction musculaire.....	13
d. Types de fibres.....	14
2. Formation du muscle squelettique	15
a. Myogenèse embryonnaire.....	15
b. Croissance néonatale et postnatale du muscle squelettique	16
3. Cellules satellites, cellules souches du muscle adulte.....	17
a. Identification des cellules satellites	17
b. Provenance des cellules satellites	18
c. Myogenèse adulte	19
II. Régulation de la masse musculaire chez l'adulte.....	23
1. Hypertrophie musculaire	23
a. Voies de signalisation impliquées dans l'hypertrophie musculaire	24
b. Contribution des cellules satellites à l'hypertrophie musculaire	25
2. Atrophie musculaire	26
a. Système ubiquitine-protéasome.....	26
b. Autophagie	26
c. Autres systèmes protéolytiques	28
d. Voies de signalisation régulant l'atrophie musculaire	29
III. Serum response factor	31
1. Expression de Srf.....	31
2. Cibles de Srf.....	32
a. Boîte CArG.....	32
b. Gènes cibles de Srf.....	33
3. Régulation de l'activité de Srf	36
a. Voie MAPK/TCF.....	36
b. Voie Rho/actine/Mrtfs.....	37
c. Autres modes de régulation de l'activité de Srf.....	41
4. Invalidation de Srf	42
a. Système digestif.....	43

b. Système nerveux	44
c. Epiderme	45
d. Système hématopoïétique	45
e. Système cardiovasculaire	45
f. Muscle squelettique	46
IV. Objectifs	50
RESULTATS.....	52
I. Première partie : régulation de l'atrophie musculaire induite par arrêt d'activité par la voie actine/Mrtfs/Srf	53
1. Article : The actin/Mrtfs/Srf axis is a key pathway controlling disuse muscle atrophy .53	
2. Conclusions principales	82
3. Résultats complémentaires.....	83
a. Implication de Srf dans l'atrophie induite par immobilisation	83
b. La résistance à l'atrophie due au maintien de l'activité de Srf n'implique pas de contribution des cellules satellites	84
c. L'inhibition de Mrtf-A/Srf par l'administration de CCG-1423 reproduit le phénotype du KO de Srf.....	85
d. L'accumulation d'actine monomérique nucléaire est due à la dénervation et non à la modulation de l'activité de Srf	86
e. La fusion mitochondriale pourrait être altérée dans les muscles dénervés dépourvus de Srf.....	89
f. Analyse des transcriptomes de muscles contrôles et mutants en situation d'atrophie musculaire	92
g. Augmentation du nombre d'autophagosomes en absence de Srf ?	95
4. Conclusion	96
II. Deuxième partie : rôle de Srf dans les cellules satellites	98
1. Résultats préliminaires.....	98
a. Srf est exprimé dans les cellules satellites après leur activation	98
b. La délétion de Srf dans les cellules satellites entraîne une altération de la régénération musculaire	99
c. L'expression de Srf dans les cellules satellites est nécessaire à l'hypertrophie compensatoire	101
d. Srf n'est pas requis pour la prolifération des myoblastes.....	102
e. Altération de la différenciation tardive en absence de Srf ?	104
f. L'absence de Srf dans les cellules satellites induit un défaut de fusion.....	106
2. Conclusion	107

DISCUSSION ET PERSPECTIVES.....	108
I. Srf, un médiateur de la mécano-transduction dans le tissu musculaire	110
II. Causes de la diminution d'activité de Srf due à l'arrêt de l'activité mécanique	111
1. Rôle de l'absence d'étirement.....	111
2. Régulation de l'activité de Srf par la voie actine/Mrtfs	111
a. Modulation de la voie actine/Mrtfs/Srf au cours de l'atrophie musculaire due à l'inactivité	111
b. Provenance des particules d'actine	112
c. Isoforme d'actine accumulée suite à la dénervation	114
3. Rôle de la signalisation associée aux molécules d'adhérence	114
4. Contrôle de l'activité de Srf par la titine et MuRF2 ?.....	115
III. Traduction des signaux interprétés par Srf.....	117
1. Régulation de la transcription des gènes codant pour des protéines sarcomériques	117
2. Influence sur la fonction mitochondriale.....	118
3. Régulation de l'autophagie ?	121
IV. Rôle de Srf dans les cellules satellites	123
1. Altération de la régénération et de l'hypertrophie musculaires des muscles mutants	123
2. Prolifération normale des myoblastes invalidés pour Srf	124
3. Altération de la différenciation des myoblastes mutants?	124
4. Défaut de fusion des myoblastes dépourvus de Srf aux fibres préexistantes	125
a. Absence de fusion des myoblastes mutants aux fibres lors de l'hypertrophie compensatoire	125
b. Anomalie d'adhérence en l'absence de Srf ?.....	126
5. Devenir des cellules.....	127
REFERENCES.....	129
ANNEXES.....	150

Table des figures

Figure 1 : anatomie du muscle squelettique adulte	11
Figure 2 : système contractile	12
Figure 3 : sarcomère	12
Figure 4 : filament d'actine	13
Figure 5 : mouvement des têtes de myosine sur les filaments d'actine.....	14
Figure 6 : origine embryonnaire des muscles squelettiques des membres et du tronc	16
Figure 7 : marqueurs des cellules satellites	18
Figure 8 : composants de la niche des cellules satellites	20
Figure 9 : division symétrique ou asymétrique.....	21
Figure 10 : myogenèse adulte	22
Figure 11 : plasticité du muscle squelettique adulte	23
Figure 12 : voies de signalisation impliquées dans l'hypertrophie musculaire.....	24
Figure 13 : différents types d'autophagie	27
Figure 14 : macro-autophagie	28
Figure 15 : voies de signalisation impliquées dans l'atrophie musculaire.....	30
Figure 16 : régions de Srf	31
Figure 17 : isoformes de Srf.....	32
Figure 18 : différentes classes de gènes cibles de Srf	33
Figure 19 : TCF	36
Figure 20 : voie MAPK/TCF	37
Figure 21 : Mrtfs et isoformes de myocardine.....	38
Figure 22 : localisation actine-dépendante de Mrtf-A	38
Figure 23 : régulation de la dynamique de l'actine par la signalisation Rho	39
Figure 24 : contrôle de l'activité de Srf par STARS	40
Figure 25 : boucle de rétrocontrôle actine/Srf.....	40
Figure 26 : régulation de l'hypertrophie compensatoire par la production de signaux paracrine par les fibres musculaires	49
Figure 27 : l'immobilisation réduit l'activité de Srf et l'atrophie musculaire subséquente est aggravée chez les mutants	83
Figure 28 : les cellules satellites ne contribuent pas à la résistance à l'atrophie acquise par l'injection d'AAV-SRFVP16	85
Figure 29 : l'inhibition de Mrtf-A/Srf par l'administration de CCG-1423 reproduit le phénotype du KO de Srf	86

Figure 30 : l'accumulation d'actine G nucléaire est due au manque d'activité mécanique et non à la modulation de l'activité de Srf	88
Figure 31 : l'absence de Srf n'induit pas de dégradation mitochondriale plus importante après dénervation	90
Figure 32 : protéines impliquées dans les processus de fusion et de fission mitochondriales.....	91
Figure 33 : la fusion mitochondriale pourrait être altérée dans les muscles dénervés dépourvus de Srf	92
Figure 34 : diagramme de Venn des ensembles de gènes variant entre mutants et contrôles lors de la dénervation et de la restriction calorique	93
Figure 35 : fonctions associées à l'autophagie significativement altérées dans les muscles mutants dénervés par rapport aux contrôles dénervés	94
Figure 36 : augmentation du nombre d'autophagosomes en absence de Srf	96
Figure 37 : la voie actine/Mrtfs/Srf contrôle l'atrophie musculaire due à un arrêt de l'activité mécanique	97
Figure 38 : Srf est très faiblement exprimé dans les cellules satellites quiescentes .	98
Figure 39 : modèle Pax7-Cre-ER ^{T2} : Srf ^{flox/flox}	100
Figure 40 : la délétion de Srf dans les cellules satellites altère la régénération musculaire	101
Figure 41 : l'absence de Srf dans les cellules satellites entraîne un défaut d'hypertrophie musculaire.....	101
Figure 42 : nombre de cellules Pax7+/Ki67+ après 7 jours d'hypertrophie compensatoire	103
Figure 43 : l'absence d'expression de Srf dans les myoblastes ne modifie pas leur taux de prolifération	104
Figure 44 : nombre de cellules Myogénine+ après 7 jours d'hypertrophie compensatoire	105
Figure 45 : altération de la différenciation tardive des cellules satellites dépourvues de Srf ?	106
Figure 46 : la délétion de Srf dans les cellules satellites provoque un défaut de fusion des cellules aux fibres préexistantes	107

Table des tableaux

Tableau 1 : caractéristiques des différents types de fibres musculaires.....	15
Tableau 2 : gènes cibles de Srf	35
Tableau 3 : phénotypes des KO de Srf.....	43
Tableau 4 : caractéristiques des types d'atrophie musculaire induits par un arrêt de l'activité mécanique	84
Tableau 5 : gènes inclus dans les fonctions liées à l'autophagie et variant spécifiquement avec la dénervation chez les mutants	95

Liste des abréviations

AAV	Adeno-Associated Virus
ABP	Actin Binding Protein
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
ADP	Adénosine DiPhosphate
ARN	Acide RiboNucléique
ATP	Adénosine TriPhosphate
CMA	Chaperone-Mediated Autophagy
CSA	Cross-sectional Area
DMPK	Myotonic Dystrophy Protein Kinase
DMSO	DiMéthylSulfOxyde
EBS	Ets Binding Site
ECM	ExtraCellular Matrix
EDL	<i>Extensor Digitorum Longus</i>
embMHC	Myosine embryonnaire
FAK	Focal Adhesion Kinase
FGF	Fibroblast Growth Factor
GAS	<i>Gastrocnemius</i>
GP	<i>Gastrocnemius + Plantaris</i>
HGF	Hepatocyte Growth Factor
IEG	Immediate Early Gene
IGF	Insulin-like Growth Factor
IGF1	Insulin-like Growth Factor 1
IL-1 β	Interleukine 1 β
ILK	Integrin-Linked Kinase
HDAC	Histone DÉACétylase
HSA	Human Skeletal Actin
KO	Knock-Out
LC3	microtubule-associated protein light chain 3
LIMK	LIM domain kinase)
MAP	Mitogen Activated Protein
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase
MADS	MCM-1, Agamous, Deficiens, Srf
MCK	Muscle Creatine Kinase
MEF	Murine Embryonic Fibroblast
MEF2	Myocyte Enhancer Factor 2

MHC	Myosin Heavy Chain
miR	microARN
MRF	Myogenic Regulatory Factor
Mrtfs	Myocardin-related transcription factors
mtDNA	mitochondrial DNA
NFAT	Nuclear Factor of Activated T cell
NLS	Nuclear Localization Signal
PE	PhosphatidylEthanolamine
PGC-1 α	PPAR (Peroxisome Proliferator Activator Receptor) Gamma Coactivator α
Pi	Phosphate inorganique
PKC α	Protein Kinase C-alpha
qPCR	quantitative Polymerase Chain Reaction
ROCK	Rho-associated protein kinase
ROS	Reactive Oxygen Species, dérivés réactifs de l'oxygène
SIDA	Syndrome d'ImmunoDéficiency Acquis
SRE	Serum Response Element
Srf	Serum response factor
STARS	STriated muscle Activator of Rho Signaling
TA	<i>Tibialis Anterior</i>
TCF	Ternary Complex Factor
TGF β	Transforming Growth Factor β
TNF α	Tumor Necrosis Factor α
TWEAK	TNF-like inducer of apoptosis

INTRODUCTION

I. Muscle squelettique

Le système musculaire de l'homme comprend environ 670 muscles squelettiques répartis entre les membres, la tête, le cou et le tronc. Chez l'adulte, la masse musculaire représente environ 40% du poids du corps.

Le muscle squelettique est excitable, contractile, élastique, extensible et plastique. Ces propriétés lui permettent de générer force et mouvement, nécessaires à la locomotion, au maintien de la posture et à la respiration, entre autres. Il est sous le contrôle du système nerveux somatique et obéit ainsi à la volonté.

1. Muscle squelettique adulte

a. Anatomie

Le muscle squelettique adulte est formé d'un ensemble de faisceaux de cellules post-mitotiques plurinucléées de 10 à 100µm de diamètre, appelées fibres musculaires. Celles-ci sont gainées d'un tissu conjonctif fin et lâche, l'endomysium. Entre la membrane plasmique des fibres, nommée sarcolemme, et la lame basale résident les cellules satellites, cellules souches du tissu musculaire squelettique adulte. Au sein du muscle, chaque faisceau de fibres est délimité par un tissu conjonctif, le périmysium, rendant solidaires les 20 à 80 fibres qui le composent. L'ensemble des faisceaux constituant le muscle est entouré d'un tissu aponévrotique inextensible appelé épimysium qui, aux extrémités du muscle, se termine par un tendon permettant la liaison du muscle à l'os (Figure 1).

L'innervation et la vascularisation d'un muscle régissant son activité, chaque muscle squelettique est parcouru par des fibres nerveuses et des vaisseaux sanguins. Ainsi, chaque fibre musculaire est en contact avec une terminaison nerveuse et un réseau de capillaires indispensable à l'oxygénation du tissu et à l'apport en nutriments (Figure 1).

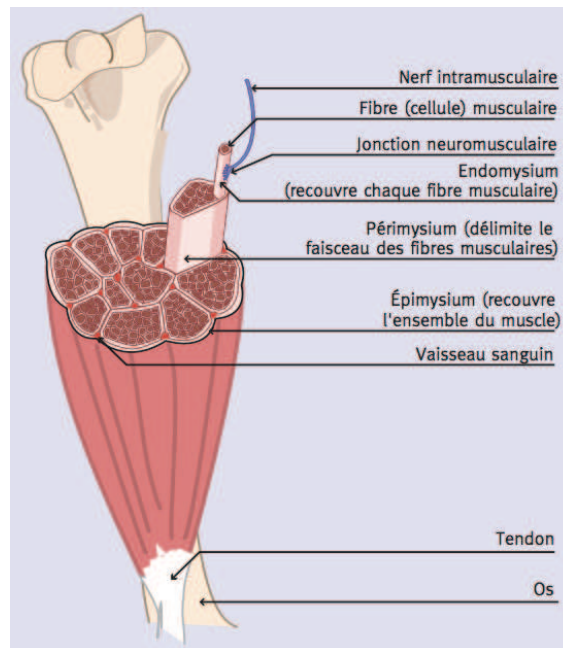


Figure 1 : anatomie du muscle squelettique adulte

(d'après Repères savoir et comprendre, AFM)

b. Système contractile

Les fibres musculaires sont constituées de faisceaux de myofibrilles, les éléments contractiles du muscle. Chaque myofibrille est formée de myofilaments fins d'actine et épais de myosine arrangés en une chaîne d'unités contractiles répétitives, les sarcomères (Figure 2).

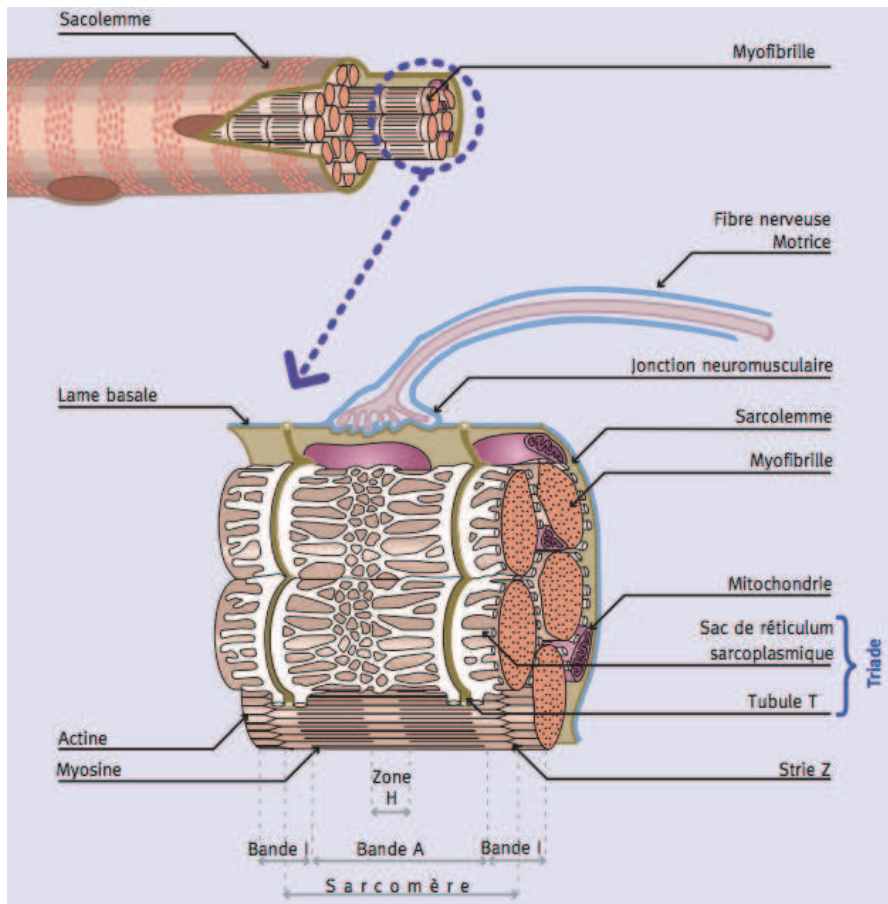


Figure 2 : système contractile

(d'après Repères savoir et comprendre, AFM)

Un sarcomère est délimité de part et d'autre par une strie Z, visible en microscopie électronique. Les filaments de myosine sont liés aux stries Z par une protéine élastique appelée titine, ou connectine, jouant un rôle primordial dans l'élasticité musculaire (Figure 3).

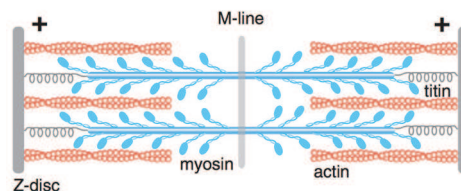


Figure 3 : sarcomère

(d'après Günther and Kruse, 2007)

La fixation des têtes de myosine aux filaments d'actine est régulée par les tropomyosines et les troponines, elles-mêmes liées à l'actine (Figure 4). Les tropomyosines sont alignées en chaînes et recouvrent les sites de fixation de la

myosine à l'actine. Des complexes de troponines (troponine T, C et I) contrôlent la position de chacune des tropomyosines par leur liaison avec le calcium. En effet, lorsque la concentration sarcoplasmique en calcium augmente, le complexe de troponines change de conformation suite à sa liaison avec des ions calcium, provoquant un déplacement des chaînes de tropomyosine et la libération des sites de fixation des têtes de myosine à l'actine.

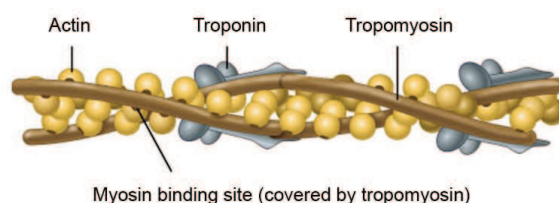


Figure 4 : filament d'actine

(<http://classroom.sdmesa.edu/eschmid/Chapter8-Zoo145.htm>)

c. Contraction musculaire

Au sein d'un muscle, chaque fibre est en contact avec un motoneurone, stimulant la contraction par le biais d'une synapse neuromusculaire, appelée jonction neuromusculaire ou plaque motrice. L'arrivée d'un influx nerveux à la jonction neuromusculaire se traduit par une libération d'acétylcholine. Celle-ci se diffuse dans la fente synaptique et se fixe à son récepteur, situé au niveau du sarcolemme. La fixation d'acétylcholine provoque une dépolarisation par l'ouverture des canaux sodium puis une repolarisation par l'ouverture des canaux potassium. Ceci résulte en l'émission d'un potentiel d'action, se propageant le long du sarcolemme. Lorsque le potentiel d'action parvient au niveau des triades, ensembles formés par une fine invagination dans le sarcolemme, le tubule T, entourée de deux sacs de réticulum sarcoplasmique, il provoque le passage d'un signal électrique du tubule T au réticulum sarcoplasmique. Ce dernier libère alors des ions calcium, qui se fixent aux troponines et permettent la libération des sites de fixation des têtes de myosine sur l'actine.

Une tête de myosine, au repos, est couplée à une adénosine diphosphate (ADP) et à un phosphate inorganique (Pi). Après le démasquage des sites de liaison de la myosine à l'actine grâce au calcium, les têtes de myosine se lient aux filaments d'actine. Le départ de l'ADP et du Pi stabilise la fixation de la myosine à l'actine et induit un changement de conformation de la myosine : l'angle que fait la tête de myosine avec la queue allongée diminue de 90 à 45°, ce qui déplace le filament d'actine. La liaison d'une adénosine triphosphate (ATP) à la tête de myosine dissocie

la liaison actine/myosine ; l'hydrolyse de cet ATP entraîne un changement de conformation de la myosine dont l'angle formé entre la tête et la queue reprend sa valeur initiale (Figure 5). Ainsi, en présence de calcium, des cycles de liaison et d'hydrolyse de l'ATP permettent le glissement des filaments d'actine sur ceux de myosine vers le centre du sarcomère, induisant le raccourcissement des sarcomères à l'origine de la contraction musculaire.

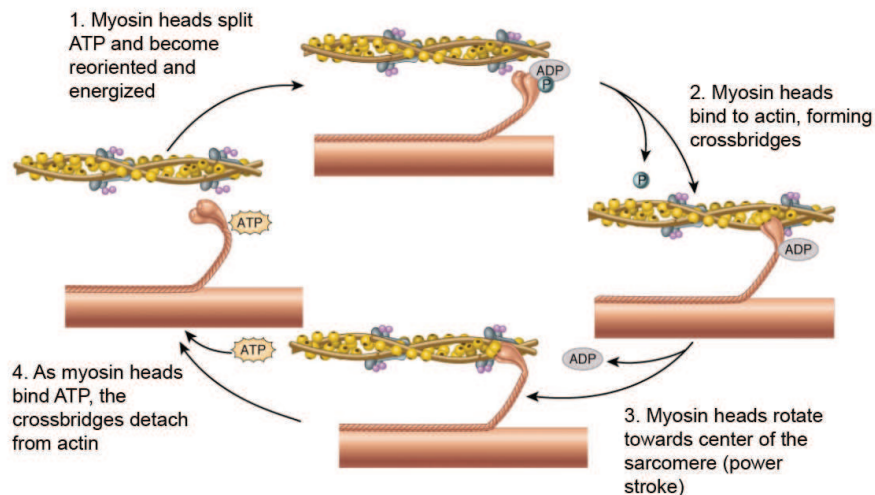


Figure 5 : mouvement des têtes de myosine sur les filaments d'actine

(<http://classroom.sdmesa.edu/eschmid/Chapter8-Zoo145.htm>)

d. Types de fibres

Les fibres musculaires sont classifiées selon le type rapide ou lent des chaînes lourdes et légères de myosine qui les composent ou selon leur degré de phosphorylation oxydative. Les fibres de type I sont lentes, à métabolisme oxydatif et résistantes à la fatigue. Elles contiennent un nombre important de mitochondries et de capillaires et sont caractérisées par une couleur rouge due à la présence d'une grande quantité de myoglobine. Les fibres de type II sont divisées en fibres de type IIa, IIx et IIb. Les fibres de type IIa sont plutôt rapides, à métabolisme oxydatif et assez résistantes à la fatigue. Les fibres de type IIx sont rapides, à métabolisme glycolytique et permettent de faire des efforts importants mais peu prolongés. Enfin, les fibres de type IIb, à métabolisme glycolytique, se contractent très rapidement et génèrent une force importante sur de courtes durées. Les caractéristiques principales des différents types de fibres musculaires sont regroupées ci-après (Tableau 1).

Tableau 1 : caractéristiques des différents types de fibres musculaires

	Type I	Type IIa	Type IIx	Type IIb
Contraction	Lente	Plutôt rapide	Rapide	Très rapide
Résistance à la fatigue	Haute	Assez haute	Intermédiaire	Faible
Force produite	Faible	Intermédiaire	Importante	Très importante
Densité mitochondriale	Très haute	Haute	Intermédiaire	Faible
Densité capillaire	Haute	Intermédiaire	Faible	Faible
Capacité oxydative	Haute	Haute	Intermédiaire	Faible
Capacité glycolytique	Faible	Haute	Haute	Haute
Source d'ATP majoritaire	Triglycérides	Glycogène, phosphocréatine	Glycogène, phosphocréatine	Glycogène, phosphocréatine
Couleur	Rouge	Rouge	Blanc	Blanc

2. Formation du muscle squelettique

a. Myogenèse embryonnaire

Les muscles du tronc et des membres dérivent des somites, structures embryonnaires résultant de la segmentation du mésoderme présomitique. En réponse à des signaux provenant du tube neural et de la notochorde, les somites se différencient et se régionalisent pour donner le dermomyotome, à l'origine des muscles des membres, du tronc et de certains muscles de la tête, et le sclérotome, à l'origine des vertèbres et des côtes (Figure 6) (Parker et al., 2003). Le dermomyotome est subdivisé en dermatome, d'où provient le derme, et en myotome, d'où sont originaires les précurseurs de la lignée myogénique (Gros et al., 2005).

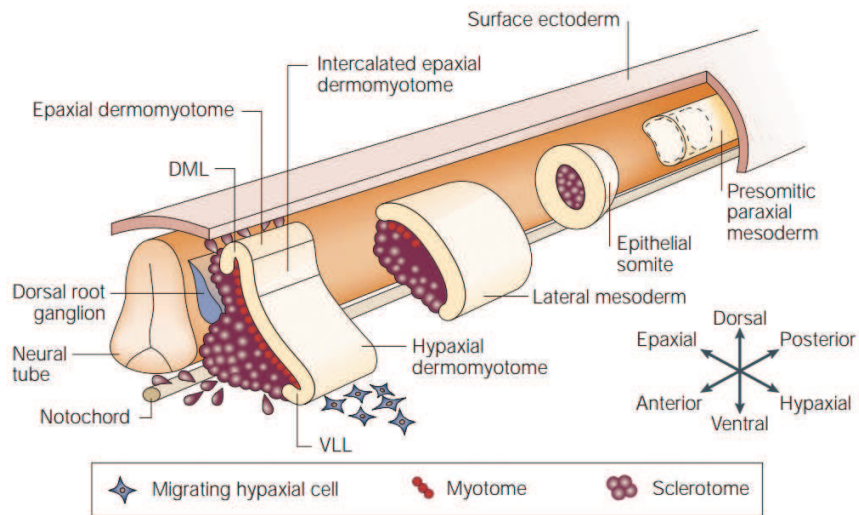


Figure 6 : origine embryonnaire des muscles squelettiques des membres et du tronc

(d'après Parker et al., 2003)

La formation de muscles squelettiques lors de l'embryogenèse nécessite l'engagement des précurseurs du dermomyotome au lignage myogénique. Ces progéniteurs sont caractérisés par l'expression des facteurs de transcription à homéodomaine *Pax3* et *Pax7*, induite par la signalisation Wnt (Jostes et al., 1990; Ben-Yair and Kalcheim, 2005). L'expression de ces gènes joue un rôle primordial dans l'activation du programme myogénique : en effet, *Pax3* est requis pour la formation des muscles du tronc et dans la migration des progéniteurs myogéniques (Daston et al., 1996; Goulding et al., 1994) et l'inactivation combinée de *Pax3* et de *Pax7* provoque un défaut d'amorçage du programme myogénique (Buckingham and Relaix, 2007). Notons que les cellules exprimant *Pax3* et *Pax7* n'ayant pas un destin myogénique présentent une répression de ces gènes au cours de leur différenciation (Esner et al., 2006).

b. Croissance néonatale et postnatale du muscle squelettique

Le muscle squelettique est formé grâce à des vagues successives de fusion de myoblastes ; on parle de myogenèse primaire, secondaire puis de croissance postnatale. Au cours de la première vague de fusion, entre E9,5 et E14,5 chez la souris, les myoblastes issus de la différenciation des précurseurs du dermomyotome s'alignent et fusionnent, créant ainsi les premières myofibrilles. Celles-ci seront la matrice d'une seconde vague de fusion de myoblastes, entre E14,5 et E16,5 chez la souris. A partir de ce moment, le nombre de fibres reste constant. La croissance

musculaire est assurée par l'augmentation du volume cytoplasmique des fibres, notamment par accumulation de protéines contractiles, et par la fusion de cellules satellites aux fibres déjà formées (Sambasivan and Tajbakhsh, 2007).

3. Cellules satellites, cellules souches du muscle adulte

a. Identification des cellules satellites

Les cellules satellites ont été identifiées en 1961, en microscopie électronique, grâce à leur localisation particulière : elles résident entre le sarcolemme et la lame basale entourant les fibres musculaires (Mauro, 1961). Dans un muscle adulte, les cellules satellites sont quiescentes et représentent seulement 2 à 7% des noyaux associés à une fibre musculaire. Elles sont caractérisées par l'expression du facteur de transcription Pax7 (Seale et al., 2000).

Pax7 est le biomarqueur généralement choisi pour localiser les cellules satellites, mais la majorité de celles-ci exprime également le facteur de transcription Pax3, le facteur de régulation myogénique Myf5, les protéines d'adhésion NCAM (ou CD56) et M-cadhérine, les sous-unités $\alpha7$ et $\beta1$ des récepteurs d'adhésion intégrine, les protéines transmembranaires syndecan 3 et syndecan 4 et les protéines de l'enveloppe nucléaire lamine A/C et émerine, entre autres (Figure 7) (Beauchamp et al., 2000; Buckingham et al., 2003; Burkin and Kaufman, 1999; Cornelison and Wold, 1997; Cornelison et al., 2001; Gnocchi et al., 2009; Irintchev et al., 1994).

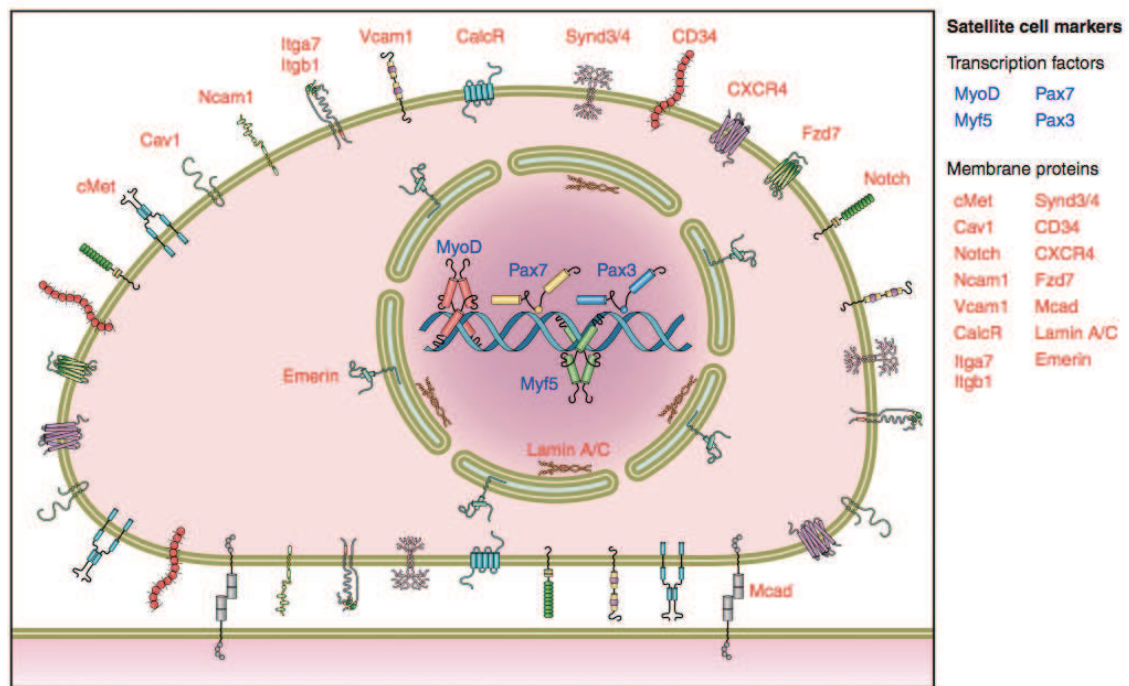


Figure 7 : marqueurs des cellules satellites

(d'après Yin et al., 2013)

b. Provenance des cellules satellites

Origine embryonnaire. La majorité des cellules satellites provient des cellules du dermomyotome exprimant *Pax3* et *Pax7*. Lors de la myogenèse embryonnaire, une grande partie de la population de cellules *Pax3*⁺/*Pax7*⁺ s'engage au lignage myogénique par le déclenchement successif de l'expression des différents facteurs de régulation myogéniques (MRF). Néanmoins, une fraction de cette population de cellules continue à proliférer jusqu'à des stades de développements tardifs et se trouve enveloppée sous la lame basale des fibres musculaires formées, prenant ainsi leur position de cellules satellites (Buckingham, 2006; Gros et al., 2005).

Autre provenance des cellules satellites adultes. Certains travaux appuient l'hypothèse selon laquelle les cellules satellites adultes ne proviendraient pas toutes de la population *Pax3*⁺/*Pax7*⁺ du dermomyotome. Par exemple, il a été montré que les péricytes participent au développement des muscles des membres et sont capables de donner des cellules en position satellite et exprimant *Pax7* (Dellavalle et al., 2011). Il est cependant admis que la contribution de cellules non myogéniques à la croissance et à la régénération musculaires est probablement mineure et que les cellules satellites sont primordiales dans ces processus (Buckingham, 2006; Cossu

and Biressi, 2005). Cela a été démontré par des expériences d'ablation des cellules satellites : les muscles adultes dépourvus de cellules satellites sont incapables de régénérer (Lepper et al., 2011; Murphy et al., 2011; Sambasivan et al., 2011).

c. Myogenèse adulte

Dans un muscle sain qui n'est pas soumis à un exercice intense, les cellules satellites sont quiescentes au sein de leur niche. Ce terme réfère à l'environnement des cellules satellites au sens large, c'est-à-dire à l'ensemble des éléments avoisinant les cellules satellites et aux facteurs biochimiques, mécaniques et électriques qu'ils produisent en vue de leur activation ou de leur maintien à l'état quiescent (Figure 8). Parmi ces éléments se trouvent la fibre musculaire, dont l'émission de signaux paracrine a notamment été montrée comme régulant les fonctions des cellules satellites par notre équipe (Guerci et al., 2012), la lame basale et les cellules endothéliales, entre autres (Montarras et al., 2013; Yin et al., 2013).

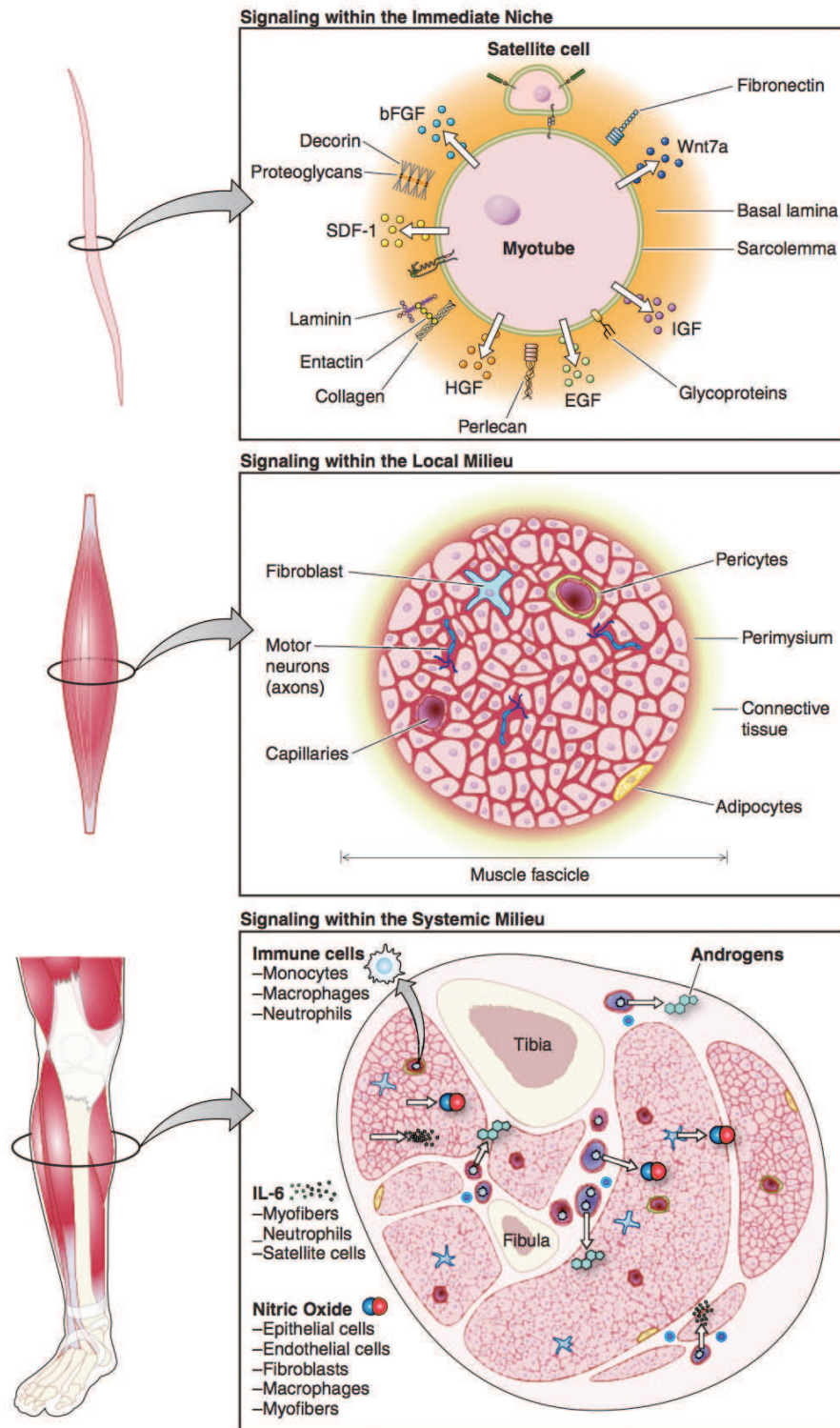


Figure 8 : composants de la niche des cellules satellites

(d'après Yin et al., 2013)

Une lésion musculaire, telle qu'une forte augmentation de l'activité musculaire ou l'exposition du muscle à une myotoxine, a pour conséquence de compromettre l'intégrité du sarcolemme des fibres. Suite à cet événement, les cellules satellites

sont les cibles d'un ensemble de signaux conduisant à leur activation. Parmi ces signaux, citons les facteurs de croissance IGF (Insulin-like Growth Factor), FGF (Fibroblast Growth Factor) et HGF (Hepatocyte Growth Factor). Les cellules satellites commencent à exprimer le facteur de régulation myogénique MyoD, en plus de Pax7 et de Myf5. On les appelle alors myoblastes. Ces derniers quittent leur niche et migrent pour atteindre le lieu de la lésion musculaire. Ils entrent alors dans le cycle cellulaire et prolifèrent, exprimant toujours Pax7, Myf5 et MyoD. Leur division peut être symétrique, générant deux cellules engagées (Pax7+/Myf5+) ou non (Pax7+/Myf5-), ou asymétrique, engendrant une cellule engagée et l'autre non (Figure 9).

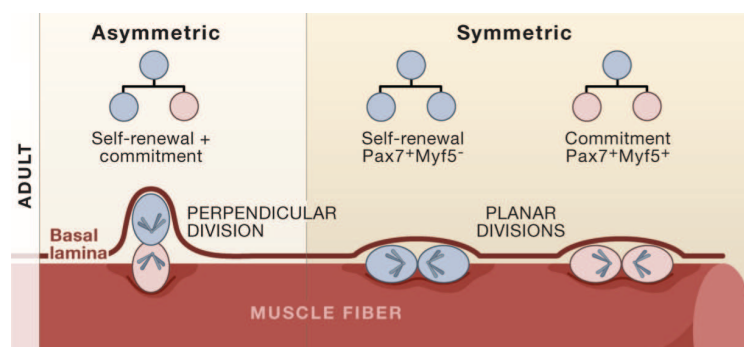


Figure 9 : division symétrique ou asymétrique

(d'après Cossu and Tajbakhsh, 2007)

Afin d'assurer l'auto-renouvellement des cellules satellites, une partie des myoblastes cesse d'exprimer MyoD et retourne à l'état quiescent, afin de maintenir la taille de la population de cellules satellites quiescentes. Les autres myoblastes sortent du cycle cellulaire par la répression de l'expression de MyoD et commencent à exprimer Myogénine. Ces événements marquent l'entrée en différenciation primaire, qui donne aux cellules le nom de myocytes. Ceux-ci s'alignent et fusionnent entre eux, formant des myotubes exprimant Mrf4 et la chaîne lourde de la myosine (MHC), ou avec les fibres préexistantes (Figure 10) (Brack and Rando, 2012; Le Grand and Rudnicki, 2007; Wang and Rudnicki, 2012; Yin et al., 2013).

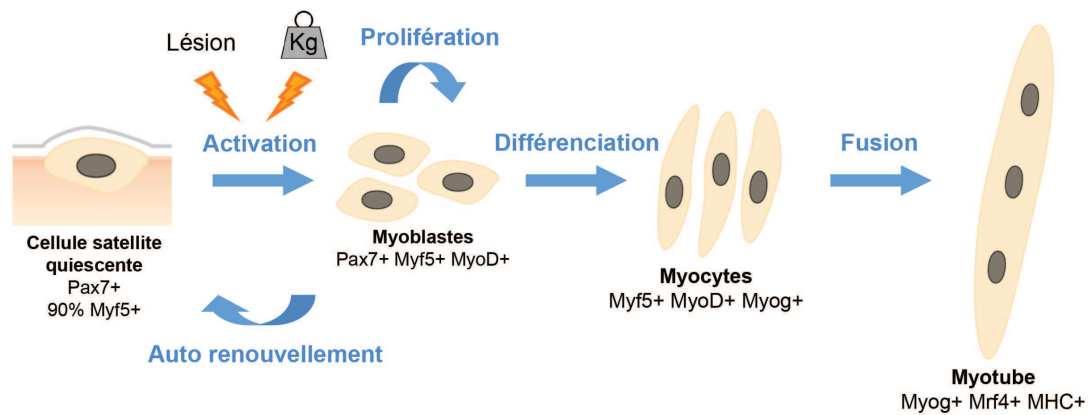


Figure 10 : myogenèse adulte

(d'après Le Grand and Rudnicki, 2007; Wang and Rudnicki, 2012)

De nombreux travaux ont permis d'identifier les différentes voies de signalisation mises en jeu dans ce processus. Il a été montré récemment que l'expression par les cellules satellites de *Rbp-j*, un coactivateur de la signalisation Notch, est cruciale pour le maintien des cellules satellites à l'état quiescent (Bjornson et al., 2012; Mourikis et al., 2012). En outre, l'inactivation de Notch3 donne lieu à une augmentation de l'auto-renouvellement des cellules satellites, indiquant que Notch3 contrôle le retour des cellules à l'état quiescent (Kitamoto and Hanaoka, 2010). Cette étape est également régulée par Sprouty1, un inhibiteur de la signalisation des facteurs de croissance. En effet, une étude a montré que l'expression de Sprouty1, restreinte aux cellules satellites quiescentes, est nécessaire au processus d'auto-renouvellement suite à la régénération (Shea et al., 2010). La signalisation Wnt a également fait l'objet de travaux approfondis ; il a été montré qu'elle contrôle l'adhésion et la prolifération des myoblastes ainsi que leur engagement au destin myogénique (Yin et al., 2013). En particulier, Wnt7a promeut la division symétrique des myoblastes *via* son récepteur Frizzled7 et l'effecteur de polarité planaire Vangl2 par une cascade Wnt7a/Fzd7/Vangl2, ce qui a pour effet d'améliorer la régénération musculaire en augmentant la population de myoblastes (Le Grand et al., 2009).

II. Régulation de la masse musculaire chez l'adulte

L'une des propriétés fondamentales du tissu musculaire adulte est sa plasticité. En réponse à une diminution ou à un arrêt des signaux mécaniques, ou à une diminution de la quantité de nutriments disponibles, le muscle squelettique s'atrophie, ce qui se traduit principalement par une réduction du volume cytoplasmique. Au contraire, lorsque la charge mécanique s'accroît, le muscle s'hypertrophie : le volume cytoplasmique et le nombre de noyaux augmentent grâce à la fusion de myocytes aux fibres. Enfin, suite à une lésion musculaire, le muscle est capable de régénérer entièrement en quelques jours grâce aux cellules satellites (Figure 11).

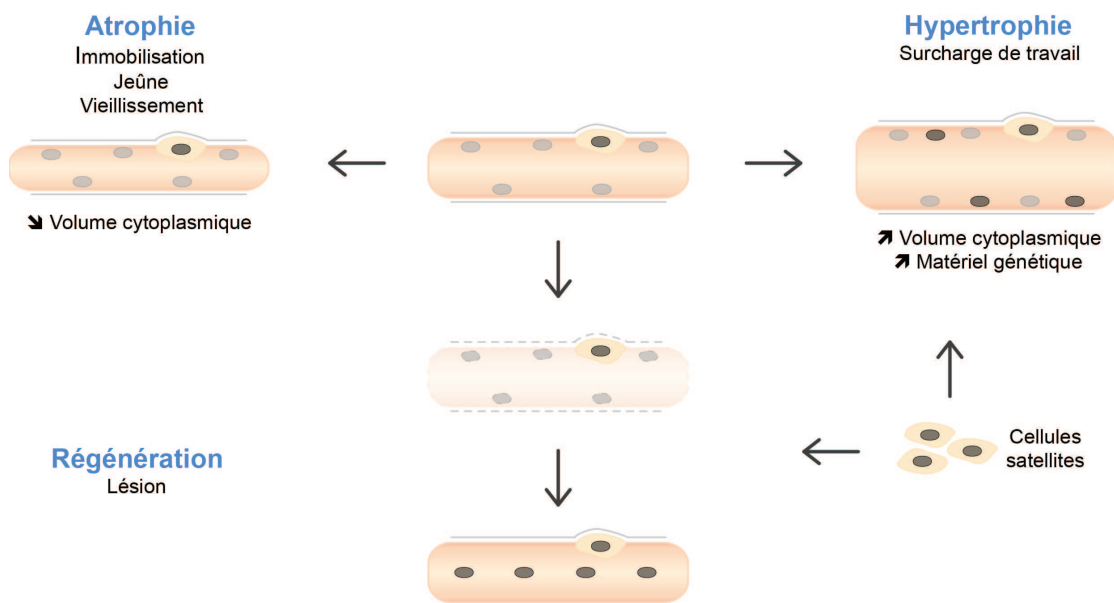


Figure 11 : plasticité du muscle squelettique adulte

1. Hypertrophie musculaire

L'hypertrophie musculaire représente l'une des réponses du muscle à une modification des signaux provenant de son environnement. En effet, suite à une augmentation des forces mécaniques ou à un changement des signaux hormonaux, entre autres, le volume cytoplasmique des fibres musculaires augmente. Ceci repose notamment sur l'accroissement de la synthèse de protéines du système contractile et sur l'inhibition de la protéolyse par la régulation de certaines voies de signalisation.

a. Voies de signalisation impliquées dans l'hypertrophie musculaire

Voie IGF1/PI3K/AKT. L'induction d'IGF1 (Insulin-like Growth Factor 1) se traduit par l'augmentation de la masse musculaire grâce à l'activation de la voie PI3K/AKT. Cette voie contrôle à la fois la synthèse et la dégradation protéiques par la régulation de trois cibles d'AKT. AKT active mTOR, qui stimule la synthèse protéique *via* la phospho-S6 kinase et EIF4EBP1, ce dernier libérant le facteur d'initiation de la traduction eIF4E. De plus, AKT réprime GSK3 β (Glycogen Synthase Kinase 3 β), qui elle-même inhibe le facteur d'initiation de la traduction eIF2B. Enfin, AKT phosphoryle les facteurs de transcription de la famille FoxO (FoxO1, 3 et 4 dans le muscle), ce qui les exclut du noyau et réprime ainsi la transcription des gènes codant pour les E3 ubiquitine ligases MAFbx/Atrogin-1 et MuRF1, médiateurs importants de la protéolyse par le système ubiquitine-protéasome (Figure 12) (Sandri, 2008; Smith et al., 2013). Il a notamment été démontré que des souris chez lesquelles AKT est activé présentent une hypertrophie musculaire et une résistance à l'atrophie musculaire induite par dénervation (Lai et al., 2004; Schiaffino et al., 2013).

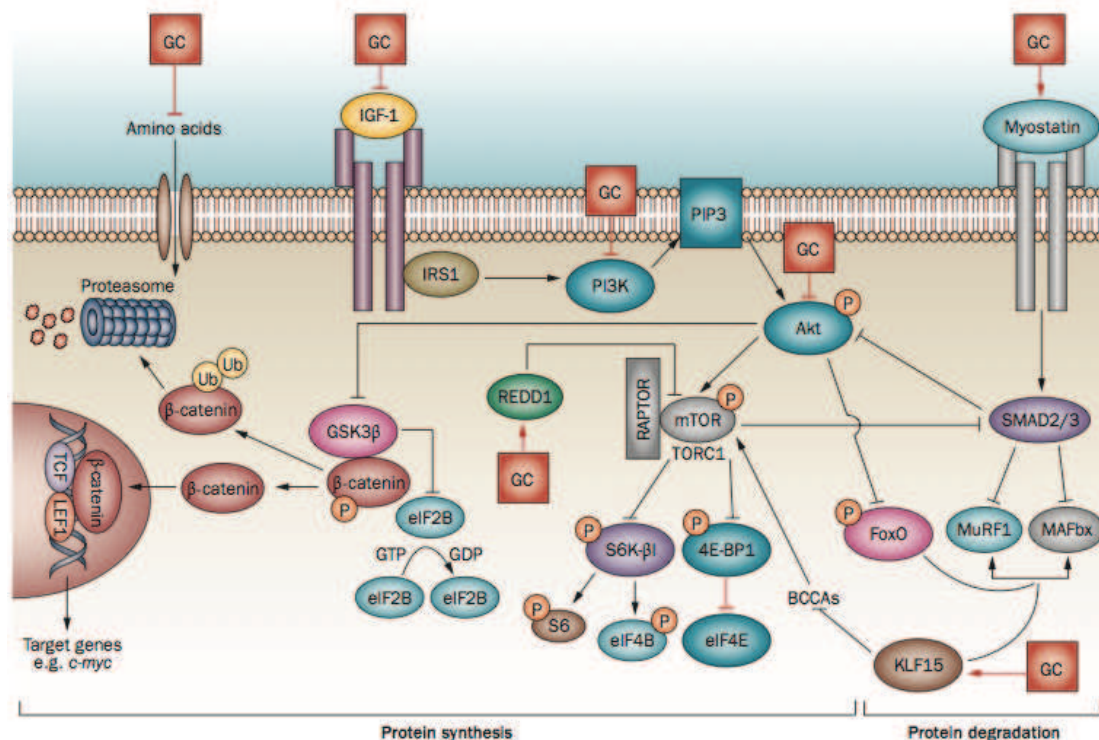


Figure 12 : voies de signalisation impliquées dans l'hypertrophie musculaire

(d'après Hanaoka et al., 2012)

Régulation follistatine/myostatine. La follistatine est une glycoprotéine dont la fonction principale est l'inhibition de la myostatine et de l'activine A. Ces dernières

sont des membres de la famille TGF β (Transforming Growth Factor β) qui inhibent l'hypertrophie musculaire *via* Smad2 et 3 en réprimant AKT et en inhibant directement l'expression des gènes codant pour les E3 ubiquitine ligases MAFbx et MuRF1 (Figure 12) (Hanaoka et al., 2012; Schiaffino et al., 2013).

Voie des MAPK. La famille des MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinases) est impliquée dans l'hypertrophie musculaire en réponse à l'exercice. Les MAPK p38 permettent, d'une part, de promouvoir la synthèse protéique en activant le facteur d'initiation de la traduction eIF4E et, d'autre part, de favoriser la différenciation myogénique en phosphorylant MyoD et en activant p21 et Myogénine (Bennett and Tonks, 1997; Lluís et al., 2005; Smith et al., 2013).

Voie calcineurine/NFAT. La calcineurine active PGC-1 α (PPAR (Peroxisome Proliferator Activator Receptor) Gamma Coactivator α) *via* les facteurs NFAT (Nuclear Factor of Activated T cell) et MEF2 (Myocyte Enhancer Factor 2). PGC-1 α réprime la transcription des gènes codant pour MAFbx et MuRF1 grâce à l'inhibition de FoxO3 (Hudson and Price, 2013).

b. Contribution des cellules satellites à l'hypertrophie musculaire

Au cours de l'hypertrophie musculaire induite par augmentation des signaux mécaniques, le nombre de noyaux par fibre augmente grâce à la fusion de myocytes provenant des cellules satellites aux fibres préexistantes (Bruusgaard et al., 2010; Kadi et al., 2005; Schiaffino et al., 1976). La nécessité de l'intervention des cellules satellites au cours de ce type d'hypertrophie musculaire demeure un sujet controversé (O'Connor and Pavlath, 2007; O'Connor et al., 2007). D'une part, plusieurs travaux reposant sur l'inactivation des cellules satellites par irradiation ont montré que les cellules satellites sont requises pour l'hypertrophie compensatoire de l'*Extensor Digitorum Longus* (EDL) après ablation du *Tibialis Anterior* (TA) (Rosenblatt and Parry, 1992; Rosenblatt et al., 1994). D'autre part, une étude récente a montré, grâce à l'utilisation d'un modèle d'ablation conditionnelle et inductible des cellules satellites dans le muscle squelettique adulte (modèle Pax7-DTA), que les cellules satellites ne sont pas indispensables à l'hypertrophie du *Plantaris* après ablation du *Gastrocnemius* et du *Soleus* (McCarthy et al., 2011). Toutefois, cette conclusion est tirée après une période d'hypertrophie compensatoire de deux semaines ; il n'est pas exclu qu'à des temps plus tardifs une différence soit visible entre les muscles contrôles et les muscles dépourvus de cellules satellites,

révélant une contribution des cellules satellites dans le maintien de l'hypertrophie plutôt que dans son installation.

2. Atrophie musculaire

Le muscle squelettique s'atrophie en réponse à une grande variété de situations, parmi lesquelles l'inactivité, l'immobilisation, la cachexie, le vieillissement normal et certaines pathologies telles que le syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA). Dans tous les cas, l'atrophie musculaire implique une diminution de la taille des fibres musculaires causée par une perte de protéines, d'organelles et de cytoplasme *via* les différents systèmes de dégradation. Notons que le nombre de noyaux des fibres n'est pas affecté par ce processus (Bruusgaard and Gundersen, 2008; Bruusgaard et al., 2010, 2012).

a. Système ubiquitine-protéasome

La voie de dégradation ubiquitine-protéasome constitue l'un des systèmes protéolytiques majeurs activés au cours de l'atrophie musculaire. Il repose sur la protéolyse totale par le protéasome 26S des protéines marquées par une chaîne d'ubiquitine. De nombreuses enzymes interviennent dans ce système, dont les E3 ubiquitine ligases qui reconnaissent le substrat et l'ubiquitylent. Parmi les différentes E3 existantes, les premières à avoir été identifiées comme spécifiques du muscle sont MAFbx et MuRF1 (Bodine et al., 2001). Les gènes codant pour ces E3 font partie des atrogènes, c'est-à-dire du groupe de gènes dont l'expression est régulée dans tous les types d'atrophie musculaire (Bodine et al., 2001; Gomes et al., 2001; Lecker et al., 2004; Satchek et al., 2007; Sandri et al., 2004). Parmi les cibles connues de MAFbx se trouvent MyoD et le facteur d'initiation de la transcription eIF3-f (Lagirand-Cantaloube et al., 2008; Tintignac et al., 2005). MuRF1 dégrade notamment la troponine I, l' α -actine et les chaînes légères et lourdes de myosine (Clarke et al., 2007; Cohen et al., 2009; Polge et al., 2011). Notons que l'analyse de modèles de souris invalidées pour MAFbx ou pour MuRF1 a révélé que les souris mutantes sont résistantes à l'atrophie musculaire (Baehr et al., 2011; Bodine et al., 2001; Cong et al., 2011).

b. Autophagie

L'autophagie, également surnommée autodigestion cellulaire, désigne l'ensemble des mécanismes par lesquels le lysosome dégrade protéines et organelles

(Codogno, 2004; Mizushima et al., 2008). Il existe en effet différents mécanismes d'autophagie : la macro-autophagie, la micro-autophagie et l'autophagie réalisée par des protéines chaperonnes (CMA) (Figure 13).

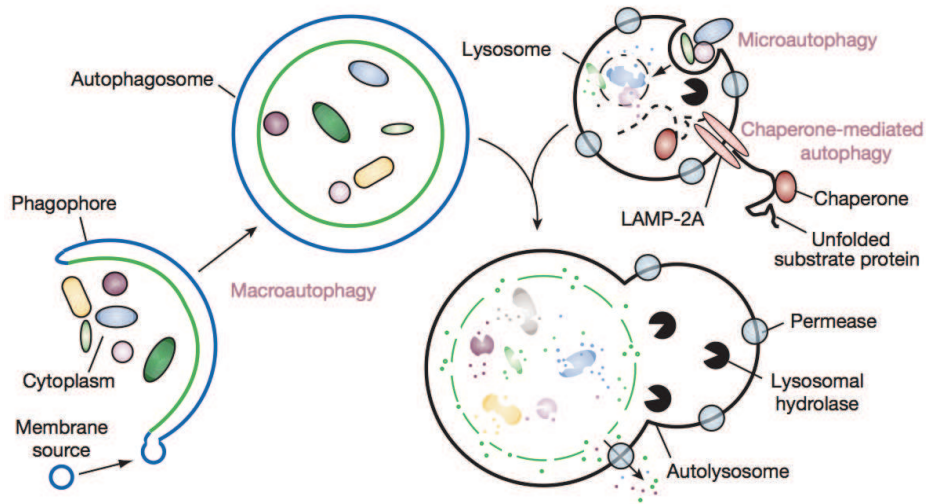


Figure 13 : différents types d'autophagie

(d'après Mizushima et al., 2008)

Ces trois phénomènes permettent une dégradation sélective de composants cellulaires. Dans le cas de la micro-autophagie, les constituants cellulaires à dégrader sont directement pris en charge par les lysosomes, grâce à des invaginations dans leur membrane (Figure 13). La CMA implique la translocation des substrats à travers la membrane lysosomale *via* des protéines chaperonnes telles qu'hsc70 interagissant avec le récepteur lysosomal LAMP-2A (Figure 13) (Dice, 2007). Le processus de macro-autophagie (qui sera simplement nommé autophagie dans la suite de ce manuscrit) repose sur la fusion de vésicules cytosoliques à double membrane contenant les constituants cellulaires à dégrader, appelées autophagosomes, aux lysosomes ; ces derniers fournissent les enzymes nécessaires à catalyser l'hydrolyse des substrats à dégrader. Ceux-ci sont séquestrés dans les autophagosomes par des protéines cargo, telles que p62, elles-mêmes liées à la membrane des autophagosomes par des protéines telles que LC3 (microtubule-associated protein light chain 3) (Figure 14) (Lamark et al., 2009a). En particulier, l'autophagie des mitochondries, ou mitophagie, participe au remodelage du réseau mitochondrial (Sandri, 2013).

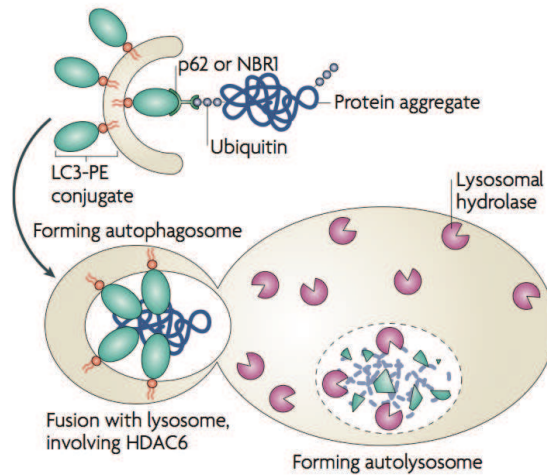


Figure 14 : macro-autophagie

(d'après Tyedmers et al., 2010)

c. Autres systèmes protéolytiques

Calpaïnes. Les calpaïnes sont une famille de protéases à cystéine dont l'activité enzymatique dépend de la concentration en calcium (Khorchid and Ikura, 2002). Trois isoformes sont exprimées dans le muscle squelettique : les calpaïnes ubiquitaires Clpn1 et Clpn 2 (ou μ - et m-calpaïnes) et la calpaïne muscle-spécifique Clpn3, environ dix fois plus exprimée que Clpn1 et Clpn 2 (Sorimachi et al., 1989). Au cours du processus d'atrophie musculaire, les calpaïnes pourraient cliver certaines protéines des myofilaments, ce qui permettrait de déstabiliser les sarcomères et de faciliter la dégradation des protéines sarcomériques par le système ubiquitine-protéasome (Williams et al., 1999).

Caspases. Les caspases sont des protéases à cystéine qui clivent leurs substrats après un résidu aspartate, d'où leur nom de cysteinyl-aspartate-cleaving proteases. Elles sont présentes dans le cytoplasme à l'état de pro-caspases et sont activées par différents mécanismes, incluant la libération de cytochrome c par les mitochondries. Leur fonction majeure est la réalisation de l'apoptose cellulaire, mais elles sont également impliquées dans la protéolyse associée à l'atrophie musculaire. En effet, il a été démontré que dans les cas d'atrophie associée à une résistance à l'insuline, la caspase-3 clive les filaments d'actomyosine, qui sont ensuite pris en charge par le système ubiquitine-protéasome (Du et al., 2004).

d. Voies de signalisation régulant l'atrophie musculaire

Voie IGF1/AKT/FoxO. Comme vu précédemment, cette voie régule à la fois la synthèse et la dégradation protéiques. L'inhibition de la voie AKT/mTOR provoque une diminution de la synthèse protéique au cours de l'atrophie, notamment due au maintien de la répression exercée sur les facteurs d'initiation de la traduction eIF2B et eIF4. Cette voie induit une augmentation de la protéolyse par le contrôle *via* AKT de la localisation des facteurs de transcription de la famille FoxO, qui sont impliqués dans le système de dégradation ubiquitine-protéasome : ils activent la transcription des gènes codant pour les ubiquitine ligases MAFbx et MuRF1 (Figure 15) (Schiaffino et al., 2013). Par ailleurs, il a été démontré que les FoxO participent au processus autophagique, puisqu'une forme constitutivement active de FoxO3 suffit à entraîner la formation d'autophagosomes par l'induction de l'expression des gènes codant pour LC3 et Bnip3, médiateurs de l'autophagie (Figure 15) (Mammucari et al., 2008). Enfin, une étude récente a montré que les FoxO activent Mul1, une ubiquitine ligase mitochondriale qui, en réponse à la dénervation ou à une période de jeûne, donne lieu à un remodelage du réseau mitochondrial et à de la mitophagie (Lokireddy et al., 2012).

Cytokines inflammatoires et NF- κ B. Les facteurs de transcription NF- κ B sont exprimés dans le muscle squelettique. Ils sont maintenus dans un état inactif par leur liaison avec une famille de protéines inhibitrices appelées I κ B. Une augmentation du niveau de cytokines inflammatoires, en particulier de TNF α (Tumor Necrosis Factor α) ou d'IL-1 β (Interleukine 1 β), active une kinase IKK qui phosphoryle I κ B. Tandis qu'I κ B est ubiquitinyllée puis dégradée par le système ubiquitine-protéasome, NF- κ B est libéré et va dans le noyau où il active la transcription NF- κ B-dépendante (Peterson et al., 2011; Schiaffino et al., 2013). Il a été montré que la surexpression de IKK β provoque une sévère atrophie musculaire, reposant notamment sur l'activation de MuRF1 et indépendante de MAFbx (Cai et al., 2004). Par ailleurs, plusieurs études indiquent que les cytokines TNF α et TWEAK (TNF-like inducer of apoptosis) induisent l'activation de la voie de dégradation ubiquitine-protéasome (Figure 15) (Li et al., 2003b; Mittal et al., 2010; Whitehouse and Tisdale, 2003).

Rôle de la myostatine. Le rôle de la myostatine dans la signalisation contrôlant l'hypertrophie musculaire est bien défini : elle réprime AKT et la transcription de *MAFbx* et de *MuRF1* par Smad2 et 3. Son implication au cours de l'atrophie musculaire est moins claire puisque son activation *in vivo* provoque une atrophie dont l'intensité dépend des publications (Durieux et al., 2007; Reisz-Porszasz et al.,

2003; Zimmers et al., 2002). Néanmoins, *in vitro*, la myostatine entraîne une cachexie par l'induction de la voie de dégradation ubiquitine-protéasome (McFarlane et al., 2006). Cette induction est dépendante de FoxO1, indépendante de NF-κB et est accompagnée d'une augmentation de l'expression de *MAFbx* et de *MuRF1*.

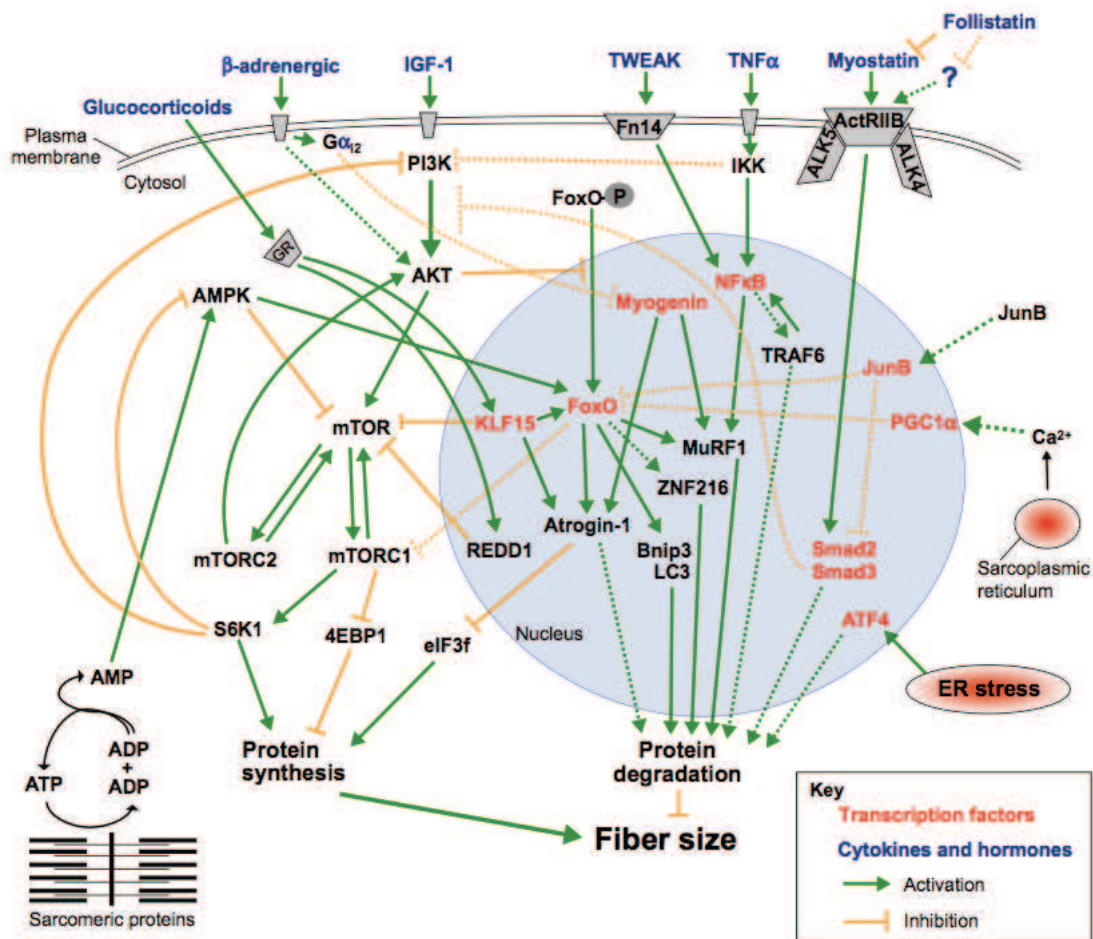


Figure 15 : voies de signalisation impliquées dans l'atrophie musculaire

(d'après Bonaldo and Sandri, 2013)

III. Serum response factor

Le facteur de transcription Serum response factor (Srf) a initialement été identifié pour son rôle d'activateur de la transcription du proto-oncogène *c-fos* en réponse au sérum dans les cellules HeLa (Treisman, 1987). Il fait partie de la famille des facteurs de transcription à domaine MADS (MCM-1, Agamous, Deficiens, Srf) (Schwarz-Sommer et al., 1990).

1. Expression de Srf

Gène. Srf est conservé de la drosophile à l'humain et est codé par un seul gène d'expression ubiquitaire (Affolter et al., 1994). Le gène *Srf* est situé sur le chromosome 6p21.1 chez l'homme et 17 chez la souris. Il comporte 7 exons, séparés par 6 introns, et s'étend sur 10607 paires de bases. *Srf* est transcrit en deux ARN messagers de 4,5 et 2,5 kb ne différant que par leur région 3' non codante et traduits en une même protéine (Chai and Tarnawski, 2002).

Protéine. La protéine Srf comporte 508 acides aminés et a un poids moléculaire de 67 kDa. La région N-terminale de Srf contient un signal de localisation nucléaire (NLS). La région intermédiaire est caractérisée par la présence d'un domaine MADS, ou MADS-box, comprenant le domaine de dimérisation de Srf et le domaine de fixation à l'ADN. Le domaine MADS constitue également l'interface d'interaction de Srf avec ses partenaires ; il a été hautement conservé au cours de l'évolution puisqu'il est identique chez l'homme, le poulet et *Xenopus* (Belaguli et al., 1997; Shore and Sharrocks, 1995). Enfin, la région C-terminale de Srf comporte le domaine d'activation transcriptionnelle (Figure 16) (Chai and Tarnawski, 2002; Johansen and Prywes, 1993).

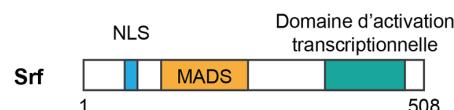


Figure 16 : régions de Srf

(d'après Posern and Treisman, 2006)

Isoformes. Quatre isoformes de Srf, produites par épissage alternatif, ont été identifiées chez la souris : Srf-L, Srf-M, Srf-S et Srf-I (Kemp and Metcalfe, 2000). Les

formes Srf-M, Srf-S et Srf-I sont dépourvues d'une partie du domaine de transactivation, ceci étant dû à la délétion de l'exon 5 dans le cas de Srf-M, des exons 4 et 5 dans le cas de Srf-S et des exons 3, 4 et 5 pour Srf-I (Figure 17). La forme Srf-M est efficacement traduite en une protéine de 57 kDa dont le domaine MADS est intact. Elle est capable de se fixer à l'ADN, de se dimériser avec Srf-L ou Srf-M et agit comme dominant négatif *in vitro* (Belaguli et al., 1999).

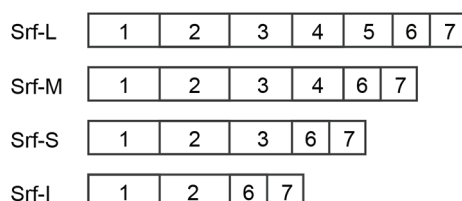


Figure 17 : isoformes de Srf

(d'après Kemp and Metcalfe, 2000)

2. Cibles de Srf

a. Boîte CArG

Srf est fonctionnel sous la forme d'un homodimère et se fixe sur une séquence cible de type $CC(A/T)_6GG$ appelée boîte CArG (Minty and Kedes, 1986; Treisman, 1987). Les gènes cibles de Srf sont caractérisés par la présence dans leur région promotrice d'une ou de plusieurs boîtes CArG permettant la liaison de Srf à l'ADN. Les éléments CArG sont classifiés en deux catégories : les éléments CArG consensus et les éléments CArG-like. Srf a une forte affinité pour les boîtes CArG consensus, représentées par des séquences de 10 paires de bases de type CCW_6GG où les W sont uniquement des nucléotides A ou T. Il y a donc 64 boîtes CArG consensus possibles. Srf présente une affinité plus faible pour les éléments CArG-like, qui sont constitués de la séquence consensus CCW_6GG contenant une déviation d'une paire de bases. Les éléments CArG-like possibles sont au nombre de 1152. Ainsi, en combinant le nombre de boîtes CArG consensus et CArG-like, on obtient 1216 permutations de CArG où Srf peut théoriquement se fixer (Miano et al., 2007a). Chez l'homme, on estime qu'environ 300 gènes présentent un élément CArG et sont activés par Srf, ce qui représente environ 1% du génome (Modak and Chai, 2010; Sun et al., 2006a). Notons que *Srf* possède deux boîtes CArG fonctionnelles dans son promoteur, faisant de lui sa propre cible.

b. Gènes cibles de Srf

Parmi les gènes cibles de Srf, on distingue différentes classes de gènes (Figure 18) (Chai and Tarnawski, 2002; Philippar et al., 2004; Sun et al., 2006a). D'une part, Srf régule l'expression d'immediate early genes (IEG) tels que *c-fos*, *fosB*, *junB*, *egr-1* et *egr-2*. Leur expression est activée rapidement suite à une stimulation, sans nécessiter la mise en place de nouvelle synthèse protéique. Ils régulent des gènes impliqués dans le cycle cellulaire ou codant pour des facteurs de croissance. Ainsi, Srf régulerait indirectement la croissance et la prolifération cellulaire. Cependant, ceci semble dépendant du type cellulaire puisque certains travaux montrent que Srf n'est pas indispensable à la prolifération (Fleige et al., 2007; Kaplan-Albuquerque et al., 2005; Koegel et al., 2009; Schratt et al., 2001), suggérant l'existence de voies compensatrices maintenant la croissance cellulaire en absence de Srf.

D'autre part, Srf a pour cibles de nombreux gènes impliqués dans l'organisation et la dynamique du cytosquelette, parmi lesquels *actinin α 1*, *perlecan*, *profilin*, *vinculin* et *tropomyosin*, entre autres (Chai and Tarnawski, 2002; Sun et al., 2006a). Srf régule également l'expression de gènes codant pour des protéines impliquées dans l'adhésion, telles que les sous-unités intégrines α 1, 5 et 9 et β 1 ou les syndecans 2 et 4 (Miano et al., 2007b).

Enfin, Srf contrôle l'expression d'un grand nombre de gènes spécifiques au muscle squelettique, lisse et cardiaque. Certains, tels que *MyoD*, sont impliqués dans la différenciation musculaire ; d'autres, tels que *Acta1*, *α - β -myosin heavy chain*, *myosin light chain* ou *troponin*, codent pour des protéines du système contractile. Certains gènes codant pour des protéines du métabolisme calcique et énergétique sont également régulés par Srf (Tableau 2) (Chai and Tarnawski, 2002; Sun et al., 2006a).

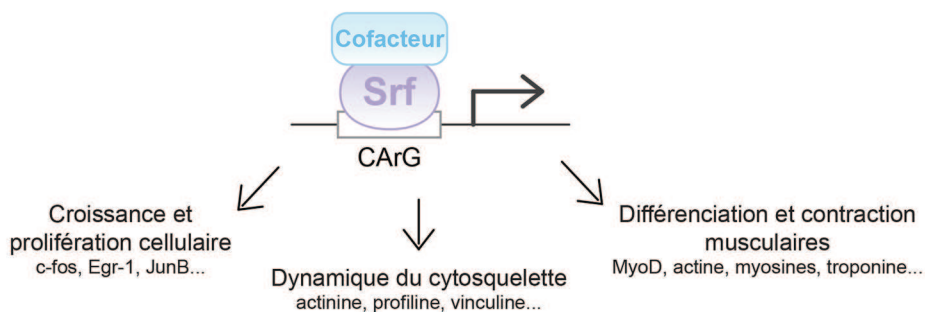


Figure 18 : différentes classes de gènes cibles de Srf

L'implication de Srf dans des mécanismes aussi différents, voire antagonistes, que la prolifération cellulaire et la différenciation musculaire repose sur l'existence de nombreux modes de régulation de l'activité de Srf.

Tableau 2 : gènes cibles de Srf

(d'après Chai and Tarnawski, 2002; Miano et al., 2007b; Sun et al., 2006a)

Gene	Protein	Function	Gene	Protein	Function
<i>Acta1</i>	actin, alpha 1, skeletal muscle	Contraction	<i>Itgb1bp2</i>	integrin beta 1 binding protein (melusin) 2	Contractile
<i>Acta2</i>	actin, alpha 2, smooth muscle, aorta	Contraction	<i>Itga1</i>	integrin, alpha 1	Adhesion
<i>Actc1</i>	actin, alpha, cardiac muscle 1	Contraction	<i>Itga5</i>	integrin, alpha 5 (fibronectin receptor, alpha polypeptide)	Adhesion
<i>Actb</i>	actin, beta	Cytoskeletal	<i>Itga9</i>	integrin, alpha 9	Adhesion
<i>Actg2</i>	actin, gamma 2, smooth muscle, enteric	Cytoskeletal	<i>Itgb1</i>	integrin, beta 1 (fibronectin receptor, beta polypeptide)	Adhesion
<i>Actn1</i>	actinin, alpha 1	Cytoskeletal	<i>Il2Ra</i>	interleukin 2 receptor, alpha	Signaling
<i>Adm</i>	adrenomedullin	Signaling	<i>JunB</i>	jun B proto-oncogene	IEG
<i>Aoc3</i>	amine oxidase, copper containing 3 (vascular adhesion protein 1)	Adhesion	<i>Copeb</i>	Kruppel-like factor 6	Transcription
<i>Actr3</i>	ARP3 actin-related protein 3 homolog	Cytoskeletal	<i>Lef1</i>	lymphoid enhancer-binding factor 1	Transcription
<i>Atp2a2</i>	ATPase, Ca ⁺⁺ transporting, cardiac muscle, slow twitch 2	Contractile	<i>Mrgprf</i>	MAS-related GPR, member F	Signaling
<i>Atp2a2</i>	ATPase, Ca ⁺⁺ transporting, cardiac muscle, slow twitch 2	Contractile	<i>Mrrf</i>	mitochondrial ribosome recycling factor	Metabolism
<i>Bin1</i>	bridging integrator 1	Transport	<i>Mrv1</i>	murine retrovirus integration site 1 homolog	Transport
<i>Cnn1</i>	calponin 1, basic, smooth muscle	Cytoskeletal	<i>Mylk</i>	myosin light chain kinase	Contraction
<i>Casq1</i>	calsequestrin 1 (fast-twitch, skeletal muscle)	Contractile	<i>Myh11</i>	myosin, heavy chain 11, smooth muscle	Contraction
<i>Car3</i>	carbonic anhydrase III, muscle specific	Metabolism	<i>Myh6</i>	myosin, heavy chain 6, cardiac muscle, alpha	Contraction
<i>Cfl1</i>	cofilin 1 (non-muscle)	Cytoskeletal	<i>Myh7</i>	myosin, heavy chain 7, cardiac muscle, beta	Contraction
<i>Cfl2</i>	cofilin 2 (muscle)	Cytoskeletal	<i>Myl2</i>	myosin, light chain 2, regulatory, cardiac, slow	Contraction
<i>Ctgf</i>	connective tissue growth factor	Signaling	<i>Myod</i>	MyoD	Transcription
<i>Coro1a</i>	coronin, actin binding protein, 1A	Cytoskeletal	<i>Nppa</i>	natriuretic peptide A	Metabolism
<i>Ckm</i>	creatine kinase, muscle	Contraction	<i>Nfatc4</i>	nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic, calcineurin-dependent 4	Transcription
<i>Cyr61</i>	cysteine-rich, angiogenic inducer, 61	Adhesion	<i>Nr4a1</i>	nuclear receptor subfamily 4, group A, member 1	Transcription
<i>Dstn</i>	destrin (actin depolymerizing factor)	Cytoskeletal	<i>Nr4a2</i>	nuclear receptor subfamily 4, group A, member 2	Transcription
<i>Dnajb1</i>	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 1	Transport	<i>Nfyb</i>	nuclear transcription factor Y, beta	Transcription
<i>Dusp6</i>	dual specificity phosphatase 6	Signaling	<i>Pdlim5</i>	PDZ and LIM domain 5	Cytoskeletal
<i>Dtna</i>	dystrobrevin, alpha	Cytoskeletal	<i>Pln</i>	phospholamban	Contractile
<i>Dmpk</i>	dystrophia myotonia-protein kinase	Signaling	<i>Pfn1</i>	profilin 1	Cytoskeletal
<i>Dmd</i>	dystrophin	Cytoskeletal	<i>P2rx1</i>	purinergic receptor P2X, ligand-gated ion channel, 1	Signaling
<i>Elf5</i>	E74-like factor 5 (ets domain transcription factor)	Transcription	<i>Rrad</i>	Ras-related associated with diabetes	Signaling
<i>Egr1</i>	early growth response 1	IEG	<i>Rnd3</i>	Rho family GTPase 3	Cytoskeletal
<i>Egr2</i>	early growth response 2	IEG	<i>Ring1</i>	ring finger protein 1	Transcription
<i>Efha1</i>	EF-hand domain family, member A1	Contractile	<i>Rogdi</i>	rogdi homolog (Drosophila)	Unknown
<i>Enah</i>	enabled homolog	Cytoskeletal	<i>Shkbp1</i>	SH3KBP1 binding protein 1	Unknown
<i>Etv1</i>	ets variant 1	Transcription	<i>Sdc2</i>	syndecan 2	Cytoskeletal
<i>c-fos</i>	FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog	IEG	<i>Sdc4</i>	syndecan 4	Cytoskeletal
<i>FosB</i>	FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog B	IEG	<i>Tln</i>	talin 1	Cytoskeletal
<i>Flna</i>	filamin A, alpha	Cytoskeletal	<i>Tspan13</i>	tetraspanin 13	Signaling
<i>Flnb</i>	filamin B, beta	Cytoskeletal	<i>Thbs1</i>	thrombospondin 1	Adhesion
<i>Fhl1</i>	four and a half LIM domains 1	Transcription	<i>Trip6</i>	thyroid hormone receptor interactor 6	Cytoskeletal
<i>Fhl2</i>	four and a half LIM domains 2	Transcription	<i>Tfap2b</i>	transcription factor AP-2 beta	Transcription
<i>Gpc4</i>	glypican 4	Signaling	<i>Tgfb1i1</i>	transforming growth factor beta 1 induced transcript 1	Adhesion
<i>Hspb7</i>	heat shock 27kDa protein family, member 7 (cardiovascular)	Cytoskeletal	<i>Tagln / Sm22a</i>	transgelin	Contraction
<i>Hspa4</i>	heat shock 70kDa protein 4	IEG	<i>Tpm2</i>	tropomyosin 2 (beta)	Contraction
<i>Hoxb5</i>	homeobox B5	Transcription	<i>Tnnc1</i>	troponin C type 1 (slow)	Contractile
<i>Hoxc6</i>	homeobox C6	Transcription	<i>Tnnt2</i>	troponin T type 2 (cardiac)	Contraction
<i>Ier2</i>	immediate early response 2	IEG	<i>Galnt3</i>	UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylglucosaminyltransferase 3	Transferase
<i>Impact</i>	impact RWD domain protein	Unknown	<i>Urod</i>	uroporphyrinogen decarboxylase	Metabolism
<i>Igf2</i>	insulin-like growth factor 2	Signaling	<i>Vcl</i>	vinculin	Adhesion
<i>Ints9</i>	integrator complex subunit 9	Unknown	<i>Wwtr1</i>	WW domain containing transcription regulator 1	Transcription

3. Régulation de l'activité de Srf

Différents travaux portant sur la régulation transcriptionnelle du gène *c-fos* en réponse au sérum ont montré que Srf est un transactivateur faible et que son association avec un coactivateur de la famille des ternary complex factors (TCF) ou de celle des Myocardin-related transcription factors (Mrtfs) est nécessaire pour l'induction de la transcription de *c-fos* (Cen et al., 2003; Schröter et al., 1990).

a. Voie MAPK/TCF

Les membres de la famille des ternary complex factors Elk-1, SAP-1 et Net représentent la première classe de coactivateurs de Srf. Ils possèdent un domaine Ets en région N-terminale, hautement conservé, leur permettant de se lier à l'ADN sur des régions de type GGA(A/T) appelées Ets binding sites (EBS) (Figure 19).

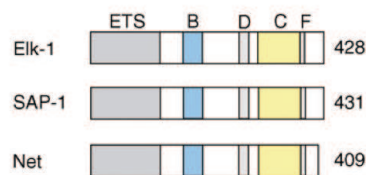


Figure 19 : TCF

(d'après Posern and Treisman, 2006)

Les TCF sont activés *via* phosphorylation par des MAPK telles que ERK, JNK ou p38 (Figure 20). En l'absence de signalisation MAPK, Sap-1 active la transcription mais Net la réprime et Elk-1 est inactif (Giovane et al., 1994). En revanche, la phosphorylation des TCF permet d'inhiber les interactions entre leur domaine C et leur domaine Ets, ce qui augmente leur capacité de liaison à l'ADN (Yang et al., 1999). En formant un complexe avec Srf et une région serum response element (SRE), définie comme une région promotrice présentant un EBS adjacent à une boîte CArG, les TCF activent la transcription de *c-fos* et d'autres IEG tels que *JunB* et *Egr1* (Buchwalter et al., 2004; Dalton and Treisman, 1992).

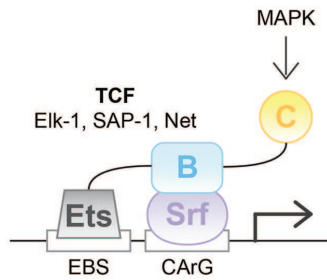


Figure 20 : voie MAPK/TCF

(d'après Posern and Treisman, 2006)

L'inactivation des différents TCF donne des phénotypes distincts selon le TCF ciblé. Le knock-out (KO) de Elk-1 chez la souris montre que Elk-1 n'est pas nécessaire au développement, à la croissance ni à la vie adulte mais qu'Elk-1 pourrait avoir un rôle dans certaines activités cérébrales (Cesari et al., 2004). La délétion de SAP-1 chez la souris induit un défaut de sélection positive des thymocytes en réponse à la signalisation Erk (Costello et al., 2004). Enfin, l'inactivation de Net dans les cellules murine embryonic fibroblasts (MEF) provoque un défaut de migration chez les cellules mutantes (Buchwalter et al., 2005). Malgré leur important degré d'homologie, les TCF n'ont donc pas forcément des fonctions redondantes au sein de l'organisme.

b. Voie Rho/actine/Mrtfs

L'activité de Srf peut aussi être contrôlée par la dynamique de l'actine et les Myocardin-related transcription factors (Mrtfs) (Olson and Nordheim, 2010; Posern and Treisman, 2006; Sotiropoulos et al., 1999).

Famille des Mrtfs. Les Mrtfs sont des cofacteurs de Srf ayant un fort degré d'homologie avec myocardine et dont la famille comprend deux membres : Mrtf-A (également nommé MAL, MKL1 ou BSAC) et Mrtf-B (ou MAL16, MKL2) (Figure 21). L'expression du gène codant pour Myocardine, *Myocd*, est restreinte au muscle cardiaque et lisse (Creemers et al., 2006; Posern and Treisman, 2006; Wang et al., 2001, 2003). Les isoformes de Myocardine sont exclusivement nucléaires et activent constitutivement la transcription Srf-dépendante (Guettler et al., 2008). En revanche, Mrtf-A et Mrtf-B sont exprimés de façon ubiquitaire et leur localisation est régulée par la dynamique de l'actine.

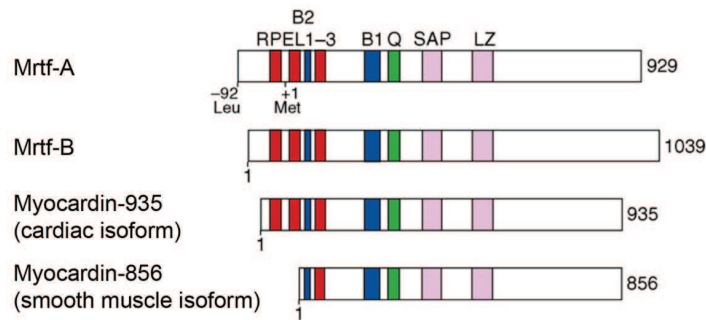


Figure 21 : Mrtfs et isoformes de myocardine

(d'après Posern and Treisman, 2006)

Localisation actine-dépendante des Mrtfs. Une étude réalisée sur des cultures de fibroblastes a montré que la localisation de Mrtf-A est majoritairement cytoplasmique et qu'une stimulation des cellules au sérum entraîne son accumulation nucléaire (Miralles et al., 2003). Les auteurs de cette étude démontrent que l'activation de la voie de signalisation Rho/actine est suffisante à induire l'import de Mrtf-A dans le noyau et que le mécanisme impliqué est basé sur la liaison de particules d'actine monomérique aux domaines RPEL (RPxxxEL) de Mrtf-A. Par la suite, il a été montré que la régulation de la localisation de Mrtf-A est un système d'import/export dynamique reposant sur la disponibilité de monomères d'actine (Vartiainen et al., 2007). En absence de sérum, la concentration d'actine monomérique est importante et favorise l'export de Mrtf-A tout en inhibant son import. Après stimulation au sérum, le phénomène de polymérisation de l'actine est augmenté, diminuant la disponibilité de l'actine monomérique et entraînant une réduction du taux d'export de Mrtf-A (Figure 22).

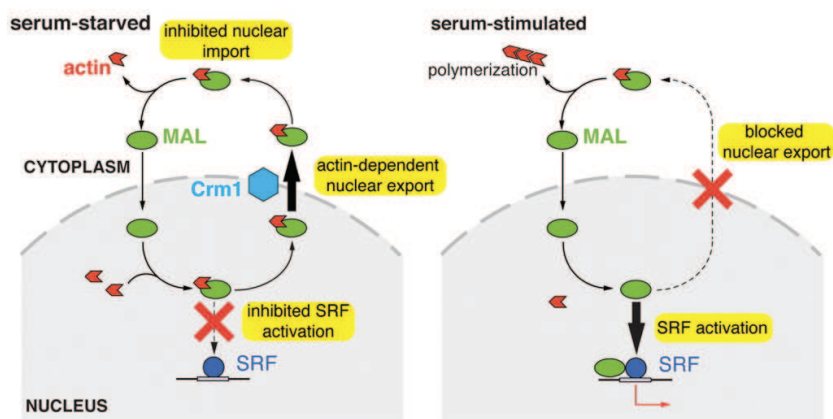


Figure 22 : localisation actine-dépendante de Mrtf-A

(d'après Vartiainen et al., 2007)

Le mécanisme régulant l'import de Mrtf-A repose sur la présence d'éléments de son domaine RPEL jouant le rôle d'un signal de localisation nucléaire (NLS) (Pawłowski et al., 2010). L'import de Mrtf-A requiert l'activité des importines α et β et est inhibé par l'actine monomérique. Des travaux de cristallographie ont suggéré que cette inhibition pourrait s'expliquer par un masquage du NLS dû à un changement de conformation de Mrtf-A suite à sa liaison à l'actine (Hirano and Matsuura, 2011).

Régulation de la dynamique de l'actine. Les protéines influençant la dynamique de l'actine régulent donc la localisation des Mrtfs et ainsi la transcription dépendante de Srf. Les GTPases de la famille Rho, telles que RhoA et Rac1, régulent les formines telles que mDia ainsi que l'activité de ROCK (Rho-associated protein kinase). mDia contrôle la profiline, une ABP stimulant sa polymérisation. ROCK contrôle l'activité de LIMK (LIM domain kinase), qui favorise la polymérisation de l'actine par la répression de l'activité de la cofiline, une ABP promouvant la dépolymérisation des filaments (Figure 23) (Hill et al., 1995; Miralles et al., 2003; Pollard and Borisy, 2003; dos Remedios et al., 2003). Par ailleurs, la profiline et la cofiline régulent la concentration en actine monomérique d'une seconde manière : elles régulent le transport de l'actine G entre noyau et cytoplasme. Il a en effet été montré qu'en association avec l'importine 9, la cofiline permet l'import de monomères d'actine dans le noyau ; au contraire, l'interaction de la profiline avec l'exportine 6 amène à l'export de l'actine G vers le cytoplasme (Dopie et al., 2012; Stüven et al., 2003).

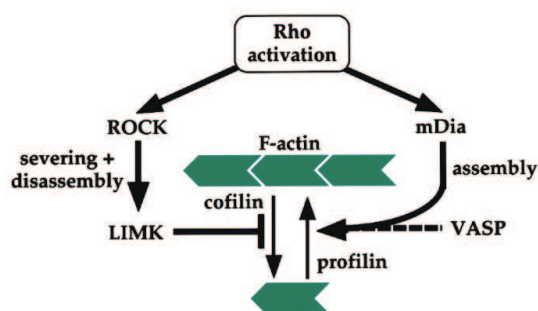


Figure 23 : régulation de la dynamique de l'actine par la signalisation Rho

(d'après Miralles et al., 2003)

Exprimée spécifiquement dans le muscle squelettique et le cœur, la protéine sarcomérique STARS (Striated muscle activator of Rho signaling) contrôle la localisation de Mrtf-A en favorisant la polymérisation de l'actine et en activant RhoA,

ce qui a également pour conséquence de promouvoir la polymérisation de l'actine (Figure 24) (Arai et al., 2002; Kuwahara et al., 2005; Zheng et al., 2009).

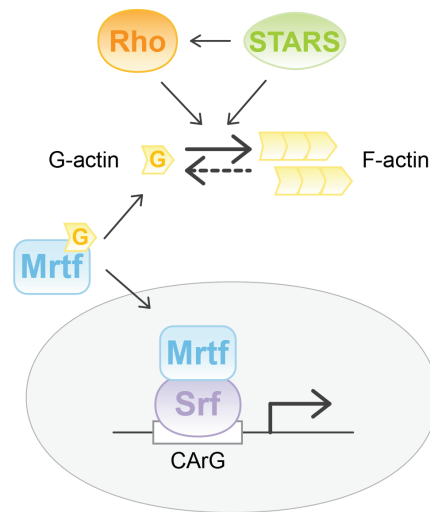


Figure 24 : contrôle de l'activité de Srf par STARS

(d'après Arai et al., 2002; Posern and Treisman, 2006)

Notons que Srf et l'actine font partie d'une boucle de rétrocontrôle complexe : l'activité de Srf est régulée par la dynamique de l'actine *via* les Mrtfs et Srf contrôle à la fois la transcription de gènes codant pour l'actine et pour des protéines de liaison à l'actine (ABP), celles-ci régulant la polymérisation ou la dépolymérisation de l'actine (Figure 25).

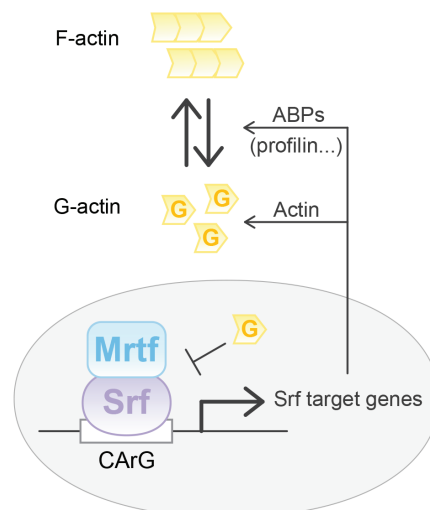


Figure 25 : boucle de rétrocontrôle actine/Srf

(d'après Olson and Nordheim, 2010; Pipes et al., 2006)

Perte de fonction. Les études de perte de fonction de Myocardine et des Mrtfs montrent que ces cofacteurs de Srf sont requis dans différents types cellulaires *in vivo* et à différents stades du développement. L'invalidation de Myocardine chez la souris provoque des anomalies vasculaires létales : les embryons *Myocd*^{-/-} meurent à E10,5 et présentent une aorte sous-développée, sans cellules musculaires lisses (Li et al., 2003a; Parmacek, 2007). La délétion de Mrtf-A n'est pas toujours létale puisque seulement 40% des embryons *Mrtf-A*^{-/-} meurent *in utero* suite à des malformations cardiovasculaires. Cependant, elle altère la maintenance de l'état différencié des cellules myoépithéliales mammaires, induisant l'apoptose de cette population cellulaire, l'involution prématurée du tissu mammaire et rendant de ce fait la lactation impossible (Li et al., 2006; Sun et al., 2006b). Par ailleurs, les embryons *Mrtf-B*^{-/-} meurent entre E17,5 et le premier jour de vie postnatale (P1) de multiples défauts dans le développement cardiaque (Li et al., 2005a; Oh et al., 2005). Enfin, dans les cellules musculaires C2C12, il a été montré qu'un dominant négatif de Mrtf-B bloque la différenciation *in vitro* (Selvaraj and Prywes, 2003) et qu'un siRNA dirigé contre STARS diminue l'activité de Srf (Kuwahara et al., 2005).

c. Autres modes de régulation de l'activité de Srf

Autres cofacteurs. De nombreux autres cofacteurs de Srf régulent positivement ou négativement l'activité transcriptionnelle de Srf. Le groupe de cofacteurs favorisant la transcription dépendante de Srf comprend les membres de la famille des facteurs de transcription à doigts de zinc GATA, la famille Nkx2.5 de protéines à homéodomaine et les protéines Cys-rich LIM-only de la famille CRP. Les partenaires inhibant l'activité de Srf incluent la protéine LIM-only FHL2, l'histone déacétylase 4 (HDAC4), la protéine à homéodomaine MSX1, la protéine à doigts de zinc krueppel-like factor 4 (KLF4) et la protéine homeodomain-only protein (HOP) (Olson and Nordheim, 2010; Posern and Treisman, 2006).

Régulation post-transcriptionnelle par miR-133. Les microARN (miR) sont des ARN non codants de 20 à 24 nucléotides dont la fonction est de réguler l'expression d'ARN messagers cibles. Ils s'apparient avec des ARN messagers cibles dont ils sont partiellement complémentaires, réprimant la traduction de l'ARN messager cible ou entraînant sa dégradation. Il a été montré que l'ARN messager de Srf est ciblé par le microARN (miR) miR-133, ce dernier étant transcrit sous le contrôle d'un promoteur muscle-spécifique dépendant de Srf (Chen et al., 2006).

Phosphorylation. La thréonine 159 et la sérine 162 du domaine MADS de Srf peuvent être phosphorylées par la myotonic dystrophy protein kinase (DMPK) et la protein kinase C-alpha (PKC α) respectivement, ce qui inhibe la fixation de Srf à l'ADN et la formation de complexes avec les Mrtfs (Iyer et al., 2003, 2006). Cela pourrait avoir pour conséquence de favoriser les interactions de Srf avec ses cofacteurs de type TCF, ces derniers possédant un domaine Ets de liaison à l'ADN permettant de stabiliser le complexe.

Clivage par les caspases. Srf possède deux sites de clivage reconnus par les caspases 3 et 7 ; le clivage de Srf engendre deux fragments majeurs incapables d'activer la transcription de *c-fos* dans les cellules humaines BJAB (Drewett et al., 2001).

Régulation par la titine et MuRF2. La titine est une protéine sarcomérique « géante » faisant la liaison entre le disque Z et la bande M (Tskhovrebova and Trinick, 2003). Elle possède un domaine tyrosine kinase qui, *via* un complexe de signalisation, lie MuRF2, une protéine à doigt de zinc muscle-spécifique capable d'interagir avec Srf. Un modèle *in vitro*, utilisant des cardiomyocytes de rat, a permis de montrer qu'un arrêt de la contraction entraîne une délocalisation de MuRF2 du cytoplasme vers le noyau, induisant une accumulation cytoplasmique de Srf et ainsi une diminution de la transcription dépendante de Srf (Lange et al., 2005).

4. Invalidation de Srf

En 1998, l'équipe de Nordheim a démontré que Srf est indispensable pour le développement embryonnaire chez la souris : les embryons *Srf*^{-/-} meurent à E12,5, avant même le commencement de l'organogenèse, et présentent une gastrulation incomplète et une absence totale de mésoderme (Arsenian et al., 1998). A ce jour, les conséquences de l'invalidation de Srf ont été étudiées dans de nombreux tissus, ceci grâce à l'utilisation de lignées de souris exprimant la Cre recombinase sous le contrôle de promoteurs spécifiques. Les phénotypes résultant de ces études sont regroupés dans le tableau suivant (Tableau 3).

Tableau 3 : phénotypes des KO de Srf

(d'après Miano, 2010)

Cre driver	Targeted cell type	Phenotype
<i>Myh7</i> (β Mhc)	Cardiomyocyte	Dilated heart and embryo demise at E10,5-E13,5
<i>Tagln</i> (<i>Sm22α</i>)	Cardiomyocyte / smooth muscle cell	Dilated heart / reduced SMC recruitment and embryo demise at E10,5
<i>Myh6</i> (α Mhc)	Cardiomyocyte	Cardiac insufficiency / reduced myocyte survival
<i>Nkx2.5</i>	Cardiomyocyte	Non-beating heart tube at E8,25
<i>Myh6-MerCreMer</i>	Adult cardiomyocyte	Heart failure and death 10 weeks after KO
<i>Des</i> (<i>Desmin</i>)	Cardiomyocyte	Heart failure and death by 11 months of age
<i>Tie1</i>	Endothelial cell	Aneurysm, hemorrhage, endothelial cell junctional / actin cytoskeletal defects and death at E14,5
<i>Tie2</i>	Endothelial cell	Hemorrhage and endothelial cell junctional / actin cytoskeletal defects, with death at E14,5
<i>Myog-Mef2c</i>	Skeletal muscle cell	Perinatal orthopnea with thinned myofibers
<i>Acta1</i> (<i>human α-skeletal actin</i>)	Adult skeletal muscle	Muscle hypotrophy and poor regeneration, with 50% mortality by 6 weeks of age / impaired hypertrophy
Tamoxifen-inducible <i>Acta1</i>	Adult skeletal muscle	Muscle atrophy (sarcopenia), defective regeneration and accelerated muscle aging
<i>Alb-Afp</i> (<i>Albumin, α-fetoprotein</i>)	Hepatocyte	Reduced body size and chronic liver regeneration
<i>Alb-Afp</i>	Hepatocyte	Impaired hepatic regeneration
<i>Pdx1</i> (<i>pancreatic / duodenal homeobox-1</i>)	All pancreatic cells	Pancreatitis, loss of exocrine pancreas
Tamoxifen-inducible <i>Tagln</i> (<i>Sm22α</i>)	Adult smooth muscle cell	Chronic intestinal pseudo-obstruction and death by 3 weeks after Srf deletion
<i>Camk2a</i> (<i>Camk11a</i>)	Forebrain neurons	Defective neuronal migration to hippocampus, impaired actin dynamics and axonal guidance
<i>Camk2a</i> or <i>Syn1</i> (<i>synapsin-1</i>)	Forebrain neurons	Attenuated activity-dependent IEG expression and long-term synaptic potentiation
<i>Camk2a</i>	Adult forebrain neurons	Impaired short-term memory and long-term depression
<i>Camk2a</i>	Hippocampal neurons	Defective layering of neurons and dendritic branching
<i>Wnt1</i>	Dorsal root ganglion	Defective extension / branching of axons
<i>Krt5</i> (<i>keratin-5</i>)	Keratinocytes	Embryonic lethality, skin hemorrhaging / blistering
<i>Krt14</i> (<i>keratin-14</i>)	Keratinocytes	Thickened epidermis, loss of barrier function and cell-cell contacts due to abnormal cytoskeleton
RU486-inducible <i>Krt14</i>	Keratinocytes	Psoriasis-like condition with epidermal hyperproliferation, cytoskeletal and cell-cell contact perturbations
<i>Cd4</i> (<i>cluster of differentiation-4</i>)	T lymphocytes	Loss in circulating T lymphocytes
<i>Cd19</i> (<i>cluster of differentiation-19</i>)	B lymphocytes	Decrease in marginal zone B cells, low IgM
<i>Mx1</i> (<i>Myxovirus resistance 1</i>)	Megakaryocyte	Thrombocytopenia and macrothrombocytopenia
<i>Pf4</i> (<i>platelet factor 4</i>)	Megakaryocyte	Thrombocytopenia and macrothrombocytopenia ; prolonged bleeding time

a. Système digestif

Foie. La délétion de Srf dans les hépatocytes conduit à la mort de 35% des souris mâles mutantes en période postnatale. Les souris mutantes qui survivent sont plus

petites que les souris contrôles et présentent un foie en état de régénération perpétuelle, avec prolifération et apoptose des hépatocytes constantes (Sun et al., 2009).

Pancréas. Srf est exprimé dans le pancréas en développement et à l'âge adulte. L'inactivation de Srf dans le pancréas ne perturbe pas le développement du pancréas endocrine ni exocrine. Après le sevrage, les souris mutantes développent une pancréatite conduisant à l'anéantissement de leur pancréas exocrine : à 11 mois, celui-ci est remplacé par du tissu adipeux. La structure et la fonction du pancréas endocrine des souris mutantes ne sont cependant pas affectées (Miralles et al., 2006).

Tractus gastro-intestinal. A l'âge adulte, l'induction par tamoxifène de la perte de Srf dans les cellules du muscle lisse est à l'origine d'un phénotype de pseudo-obstruction intestinale chronique, se caractérisant par une dilatation intestinale chronique et un défaut de contractilité des cellules du muscle lisse. Les souris mutantes sont atteintes de cachexie et meurent 2 à 3 semaines après la perte de Srf (Angstenberger et al., 2007; Mericskay et al., 2007).

b. Système nerveux

Système nerveux central. La délétion de Srf dans les cellules du prosencéphale, au cours de la période périnatale, entraîne une perturbation de la migration neuronale résultant en une accumulation de neurones précurseurs dans la zone subventriculaire. Les souris mutantes ont des défauts d'équilibre, se désintéressent de l'alimentation et meurent à P21 environ (Alberti et al., 2005). Lorsque la perte de Srf est induite à l'âge adulte dans les cellules du prosencéphale, le comportement des souris mutantes est atteint, ceci malgré un nombre de neurones inchangé. En effet, il leur est difficile de s'accoutumer à un nouvel environnement et elles ont des capacités de mémorisation et d'apprentissage diminuées (Etkin et al., 2006).

Système nerveux périphérique. L'inactivation de Srf dans les neurones sensoriels du ganglion spinal est létale : les embryons mutants meurent entre E13,5 et E17,5. La viabilité et la maturation des neurones sensoriels du ganglion spinal ne sont pas atteintes par l'absence de Srf. En revanche, l'étude montre que Srf joue un rôle crucial dans les processus d'extension et de ramification des axones de ces neurones (Wickramasinghe et al., 2008).

c. Epiderme

Chez l'embryon de souris, la délétion de Srf dans les kératinocytes est létale à E16,5 lorsque l'expression de la Cre recombinase est dirigée par le promoteur de *Krt5*. Les embryons mutants présentent une diminution de l'adhésion et de la différenciation des kératinocytes ainsi qu'une réduction des contacts cellule-cellule et cellule-matrice au sein des couches épidermiques (Koegel et al., 2009). Lorsque l'inactivation de Srf est occasionnée par une Cre sous le contrôle du promoteur de *Krt14*, les souris naissent mais développent rapidement des lésions inflammées de l'épiderme présentant des kératinocytes qui hyper-prolifèrent, dont la différenciation est anormale et l'architecture du cytosquelette perturbée (Koegel et al., 2009).

d. Système hématopoïétique

Lymphocytes. Le KO de Srf dans les lymphocytes T induit un défaut de maturation de ces cellules, dont la population est indétectable chez les souris mutantes. Lorsque la délétion de Srf est spécifique aux lymphocytes B, le nombre de lymphocytes B de la zone marginale est réduit et ceux-ci présentent une diminution de l'expression de certains marqueurs de surface (Fleige et al., 2007).

Mégacaryocytes. Les mégacaryocytes sont responsables de la production de thrombocytes, ou plaquettes sanguines. La perte de Srf dans les mégacaryocytes engendre une augmentation du nombre de ces cellules et leur accumulation dans la moelle osseuse et la rate. De plus, les souris mutantes présentent une diminution du nombre de thrombocytes (macrothrombocytopenie) et l'architecture du cytosquelette d'actine des mégacaryocytes et des thrombocytes est anormale, rendant les thrombocytes dysfonctionnels et prolongeant le temps de saignement (Halene et al., 2010).

e. Système cardiovasculaire

Cœur. Chez l'embryon, l'expression de Srf est détectée dans le cœur dès E7,75, lorsque les cellules progénitrices cardiaques migrent pour former le tube cardiaque. La délétion de Srf perturbe la formation des sarcomères des cardiomyocytes, le développement de trabéculations dans les ventricules et les embryons meurent à E11,5 avec un myocarde anormalement fin, des cavités cardiaques dilatées et un septum interventriculaire désorganisé (Miano et al., 2004; Parlakian et al., 2004). Dans le cœur adulte, l'inactivation de Srf provoque une augmentation de la fibrose et une hypertrophie cardiaque. Les souris mutantes meurent à 11 mois d'un arrêt

cardiaque, généralement dû à un défaut d'organisation des sarcomères induisant un manque de force de contraction (Parlakian et al., 2005).

Cellules endothéliales. L'abolition de l'expression de Srf dans les cellules endothéliales cause une perturbation des complexes composant les jonctions intercellulaires endothéliales. L'expression de certaines protéines faisant partie de ces complexes, telles que l'E-cadhérine ou la vascular endothelial cadherin (VE cadherin), est réduite chez les embryons mutants, qui meurent à E14,5 (Franco et al., 2008; Holtz and Misra, 2008).

Muscle lisse. L'inactivation de Srf dans les cellules musculaires lisses de l'embryon induit une forte diminution du nombre de progéniteurs aortiques à E10,5 (Miano et al., 2004). De plus, dans des cultures primaires de cellules humaines issues de l'artère coronaire, un siRNA dirigé contre Srf inhibe la prolifération par un arrêt du cycle cellulaire en G1 et provoque une sénescence cellulaire (Werth et al., 2010). A l'âge adulte, la perte de Srf dans les cellules musculaires lisses entraîne une diminution de la contractilité artérielle et une rigidification des artères carotides (Galmiche et al., 2013).

f. Muscle squelettique

Données obtenues *in vitro*. L'invalidation de Srf réalisée par la transfection de cellules myogéniques C2C12 avec un ARN antisens dirigé contre Srf et inducible par la dexaméthasone a montré que Srf est indispensable pour la prolifération et la différenciation de ces cellules (Soulez et al., 1996). En outre, il a été montré sur des cellules C2C12 que l'inhibition de l'activité de Srf par un dominant négatif, par compétition avec un oligonucléotide SRE ou par des anticorps dirigés contre Srf prévient l'expression du facteur de régulation myogénique MyoD (Gauthier-Rouviere et al., 1996).

Développement embryonnaire. En 2005, les équipes d'Eric Olson et d'Alfred Nordheim publient ensemble deux modèles d'invalidation de Srf dans le muscle squelettique chez l'embryon, démontrant que Srf joue un rôle crucial dans le développement du système musculaire squelettique (Li et al., 2005b). Le premier modèle repose sur l'utilisation d'une Cre recombinase dont l'expression est contrôlée par le promoteur de *myogenin* et par l'enhancer muscle-spécifique de *MEF2C*. Le transgène est appelé Myo-Cre et permet l'expression de la Cre, dans le muscle

squelettique, de E8,5 à l'âge adulte. Le second modèle s'appuie sur l'expression d'une Cre dirigée par le promoteur du gène codant pour la Muscle Creatine Kinase (MCK), permettant la délétion de *Srf* à un stade embryonnaire plus tardif que dans le premier modèle. Le phénotype est plus sévère chez les mutants Myo-Cre, chez lesquels la délétion de *Srf* a lieu plus tôt dans le développement, mais les deux modèles entraînent une sévère hypoplasie musculaire dont les souris mutantes meurent durant la période périnatale (Li et al., 2005b).

Croissance périnatale. Afin d'étudier le rôle de *Srf* dans le développement musculaire périnatal, l'équipe dont je fais partie a utilisé un modèle de souris dans lequel la recombinaison Cre est sous le contrôle du promoteur du gène codant pour la Human α -Skeletal Actin (HSA) (Charvet et al., 2006). Cette Cre étant sous le contrôle du promoteur HSA, son expression est donc restreinte aux fibres musculaires. En outre, il a été montré que cette Cre commence à être exprimée à E9 et que son niveau d'expression maximum est atteint durant la période périnatale (Miniou et al., 1999).

A la naissance, les souris mutantes paraissent normales mais, dès 3 jours, elles présentent un retard de croissance par rapport aux souris contrôles. Seulement 50% des mutants survivent à 6 semaines et ceux-ci montrent un sévère retard de croissance, des scolioses et une masse musculaire 75% inférieure aux contrôles. A l'âge adulte, les muscles des mutants ont des fibres de taille réduite et plus d'espace interstitiel que les contrôles, signes d'immaturité du muscle. De plus, les muscles des mutants révèlent des défauts de structure : sarcomères désorganisés, myofibrilles arrangées de façon irrégulière et accumulation de glycogène (Charvet et al., 2006).

Adulte. L'inactivation de *Srf* dans le muscle squelettique adulte a été réalisée, dans mon équipe, grâce à l'utilisation d'une recombinaison Cre inducible par le tamoxifène et dont l'expression est sous le contrôle du promoteur HSA (Lahoute et al., 2008). Son expression est restreinte aux fibres musculaires et aux myocytes en phase de différenciation terminale (Guerci et al., 2012).

De façon surprenante, malgré une forte diminution de l'expression de *Srf* et des gènes codant pour l' α -actine squelettique et l' α -actine cardiaque (*Acta1* et *Actc1*, respectivement), aucun phénotype n'est visible chez les mutants avant 5 mois post-tamoxifène, ce qui suggère qu'avant ce moment *Srf* n'est pas requis dans le maintien des fibres musculaires. A partir de 5 mois après l'injection de tamoxifène, les mutants présentent un vieillissement musculaire prématuré, caractérisé par une diminution de la taille des fibres musculaires, une désorganisation des sarcomères,

une diminution du nombre de fibres rapides au profit du nombre de fibres lentes, l'apparition de fibrose et une accumulation de lipides au sein du tissu musculaire (Lahoute et al., 2008). Notons qu'il a été démontré chez la souris et chez l'homme que l'expression de Srf dans le muscle diminue au cours du vieillissement naturel (Lahoute et al., 2008; Sakuma et al., 2008).

Par ailleurs, des expériences d'hypertrophie compensatoire du *Plantaris*, par section des tendons du *Gastrocnemius* et du *Soleus*, réalisées au laboratoire sur ce modèle, ont révélé que le muscle est incapable de s'adapter à une surcharge de travail si les fibres sont dépourvues de Srf (Guerci et al., 2012). En effet, les muscles des mutants ne présentent aucune augmentation en poids ni en diamètre des myofibres, contrairement aux muscles contrôles, 7 et 21 jours après le début de la période d'hypertrophie compensatoire. Afin de déterminer si Srf est requis pour l'augmentation du volume cytoplasmique et/ou pour le recrutement de cellules satellites au cours de l'hypertrophie compensatoire, l'équipe a réalisé des expériences d'hypertrophie reposant uniquement sur l'augmentation du volume cytoplasmique et non sur l'ajout de matériel génétique. *In vitro*, un traitement à l'IGF1, précédemment décrit comme induisant une hypertrophie des myotubes sans ajout de noyaux (Ohanna et al., 2005), provoque une hypertrophie identique chez des myotubes invalidés pour Srf et des myotubes contrôles. *In vivo*, l'électroporation d'une forme constitutivement active d'Akt1 (Myr-Akt), entraînant une hypertrophie musculaire sans participation des cellules satellites (Blaauw et al., 2009), conduit à l'hypertrophie des fibres électroporées, qu'elles soient contrôles ou dépourvues de Srf. Ainsi, Srf n'est pas requis pour l'hypertrophie pour l'augmentation du volume cytoplasmique contrôlée par IGF et PI3K. En revanche, l'analyse des fonctions des cellules satellites montre que la prolifération des myoblastes et leur fusion aux fibres préexistantes sont altérées dans les muscles mutants. Les fibres seules étant invalidées pour Srf, la fibre musculaire exerce donc un contrôle paracrine, dépendant de Srf, nécessaire à la prolifération et la fusion des cellules satellites lors de l'hypertrophie compensatoire (Figure 26) (Guerci et al., 2012).

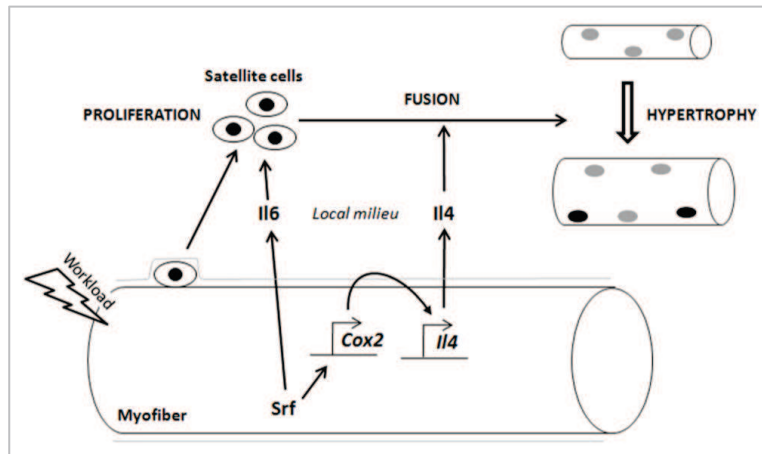


Figure 26 : régulation de l'hypertrophie compensatoire par la production de signaux paracrine par les fibres musculaires

(d'après Guerci et al., 2012)

IV. Objectifs

Des travaux antérieurs réalisés dans l'équipe ont permis d'établir un lien entre Srf et croissance musculaire. D'une part, Srf est nécessaire à la croissance musculaire postnatale, puisque son invalidation chez des nouveau-nés provoque un sévère défaut de croissance postnatale et entraîne le développement d'une myopathie caractérisée par des fibres musculaires hypotrophiques (Charvet et al., 2006). D'autre part, l'équipe a montré, grâce à un modèle de KO conditionnel et inductible de Srf chez l'adulte, que ce dernier joue un rôle crucial au cours de l'hypertrophie musculaire par surcharge de travail : les muscles sont incapables de s'hypertrophier en absence de Srf (Guerci et al., 2012). Srf semble ainsi être un acteur majeur de la plasticité musculaire et pourrait jouer un rôle au cours du processus d'atrophie musculaire. Cette hypothèse est soutenue par une étude démontrant que l'atrophie musculaire induite par immobilisation est associée à une diminution de la transcription de certains gènes cibles de Srf codant pour des protéines sarcomériques, telles que l' α -actine squelettique, qui pourrait participer à l'atrophie (Giger et al., 2009). Le premier objectif de ma thèse est donc de déterminer si Srf contribue à l'atrophie du muscle squelettique. Si Srf est impliqué dans l'atrophie musculaire, quel est son rôle ? Et quel(s) mécanisme(s) régule(nt) son activité dans ce contexte ?

L'équipe a également montré que Srf n'est requis pour l'hypertrophie musculaire que lorsque celle-ci est provoquée par une augmentation de l'activité mécanique (Guerci et al., 2012), et ce type d'hypertrophie est associé à une augmentation de l'expression de Srf (Carson and Booth, 1999; Flück et al., 1999; Sakuma et al., 2003). Par ailleurs, lors du vieillissement, situation au cours de laquelle est il communément admis que l'activité physique est réduite, l'expression de Srf diminue (Lahoute et al., 2008) et la capacité du muscle à s'hypertrophier est réduite (Blough and Linderman, 2000; Carson et al., 1995). Ces données suggèrent que Srf pourrait être un senseur de l'activité biomécanique. Afin de tester cette hypothèse, nous allons soumettre des souris à des processus d'atrophie induits par différents stimuli. En effet, comparer les conséquences sur l'activité de Srf d'un processus d'atrophie induit par un arrêt de l'activité mécanique ou par une restriction en nutriments permettra de confirmer le rôle de Srf dans la mécano-transduction.

Enfin, il a été démontré par l'équipe que l'incapacité des muscles dépourvus de Srf à s'hypertrophier est due à un défaut dans le dialogue paracrine s'établissant entre la fibre musculaire et la cellule satellite au cours du processus d'hypertrophie. L'absence de Srf dans la fibre est ainsi à l'origine d'un défaut de prolifération des

cellules satellites et de leur recrutement aux fibres préexistantes (Guerci et al., 2012). Afin d'aller plus loin dans l'élucidation du rôle de Srf au cours de l'hypertrophie compensatoire, le dernier objectif de ma thèse est d'étudier le rôle de Srf dans les cellules satellites. En tirant parti d'un modèle d'inactivation conditionnelle et inducible de Srf dans les cellules satellites, je pourrai évaluer *in vivo* la contribution de Srf à la myogenèse adulte.

RESULTATS

I. Première partie : régulation de l'atrophie musculaire induite par arrêt d'activité par la voie actine/Mrtfs/Srf

1. Article : The actin/Mrtfs/Srf axis is a key pathway controlling disuse muscle atrophy

The actin/Mrtfs/Srf axis is a key pathway controlling disuse muscle atrophy

Laura Collard^{1,2,3}, Aline Guerci^{1,2,3}, Dominique Daegelen^{1,2,3} and Athanassia Sotiropoulos^{1,2,3*}

1. Inserm U1016, Institut Cochin, F-75014 Paris, France
2. CNRS UMR8104, F-75014 Paris, France
3. Université Paris Descartes, F-75006 Paris, France

*Corresponding author:

Athanassia Sotiropoulos

24 rue du Faubourg Saint-Jacques, F-75014 Paris, France

Telephone number +33 1 44 41 24 32

Fax number +33 1 44 41 24 21

Email address athanassia.sotiropoulos@inserm.fr

Abstract

Skeletal muscle atrophy is a debilitating process that can be caused by inactivity, disease or aging. Disuse atrophy involves increased protein catabolism and decreased sarcomeric protein encoding gene expression. Here, we investigate the role played by the actin/Mrtfs/Srf pathway in muscle atrophies of differing origin. We demonstrate that the actin/Mrtfs/Srf axis is downregulated in denervation-induced atrophy but not in caloric restriction. We show that an absence of mechanical signals causes a nuclear G-actin increase and a rapid shuttling of the Srf coactivator Mrtf-A from myonuclei to a newly-described perinuclear area. This shuttling leads to Srf activity downregulation, resulting in Srf-dependent transcription decrease which contributes to atrophy. Furthermore, we show that maintenance of either high Srf or Mrtfs activity in denervated muscle counteracts atrophy. Altogether, our results highlight Srf as a key mediator of mechanotransduction in skeletal muscle tissue and identify the actin/Mrtfs/Srf circuit as a crucial pathway in disuse atrophy.

Introduction

Skeletal muscle is a plastic tissue the homeostasis of which relies on nutrient availability and mechanical cues. Loss of muscle mass occurs with muscle inactivity due to immobility/unloading and/or nerve injury. The normal aging process and several chronic diseases are characterized by muscle wasting, which results in decreased muscle activity, leading to a vicious circle, further worsening muscle performance and quality of life.

Muscle atrophy always entails loss of protein, organelle and cytoplasm and involves protein breakdown pathways (Bonaldo and Sandri, 2013). In particular, the ubiquitin-proteasome system induces the degradation of sarcomeric proteins such as troponin I, α -actin, myosin heavy and light chains *via* the muscle E3 ubiquitin ligase MuRF1 (Clarke et al., 2007; Cohen et al., 2009; Polge et al., 2011). The E3 ligase Trim32 is involved in the degradation of α -actin, tropomyosin, α -actinin and desmin (Cohen et al., 2012). Interestingly, in addition to increased protein degradation, disuse atrophy is associated with a decrease in the expression of genes encoding sarcomeric proteins such as α -skeletal actin and myosin heavy chain (Giger et al., 2009; Lamon et al., 2009). This suggests that the control of muscle mass does not solely stem from post-translational regulation but also from transcriptional/pre-translational regulatory processes. The specific transcription factors involved in this regulatory program remain largely unknown.

Serum response factor (Srf) is a member of the MADS-box transcription factor family. One major class of Srf targets is muscle-specific and comprises several genes encoding sarcomeric proteins (*α -actins, myosin light chain*) (Pipes et al., 2006). The ability of Srf to regulate downstream target genes depends on its association with coactivators including Ets domain proteins, which are activated by MAPK phosphorylation, and Myocardin-related transcription factors Mrtf-A and Mrtf-B (Posern and Treisman, 2006). The Rho family of small GTPases and actin dynamics control the nuclear accumulation of Mrtfs and Srf activity (Miralles et al., 2003). Using a mouse model of adult myofiber *Srf* deletion, we previously reported that Srf is crucial for adult skeletal muscle growth and homeostasis during aging (Guerci et al., 2012; Lahoute et al., 2008). To date, there is no evidence that Mrtfs are implicated in adult myofiber plasticity *in vivo*.

In this study, we investigate the role of the actin/Mrtfs/Srf pathway in skeletal muscle atrophy of differing origins using mice with either *Srf*-deleted muscle or muscle overexpressing active Srf / Mrtf-A derivatives. Using different atrophy models, we demonstrate that overall Srf activity is reduced and specifically implicated in

disuse atrophy. Further, our study indicates that denervation-decreased Srf activity is governed by a modulation of the actin/Mrtfs pathway through an increase in the nuclear G-actin content, which results in a decrease in intra-myonuclear Mrtfs. Our findings identify Srf as an important mediator of mechanotransduction in muscle tissue and the actin/Mrtfs/Srf axis as a crucial pathway whose functional relevance is specific to disuse atrophy.

Results

Srf activity decreases upon disuse atrophy.

To examine the contribution of Srf to skeletal muscle atrophy, we first tested whether Srf activity was modulated following denervation. Srf transcriptional activity was assessed *in vivo* by electroporation of a Srf luciferase reporter construct in *Tibialis Anterior* (TA) muscle 5 days prior to denervation. Luciferase activity, measured in denervated and contralateral electroporated TA 7 days post-denervation, showed a significant reduction of Srf transcriptional activity in denervated TA (Fig 1A). The consequence of this reduction on the expression of Srf endogenous target genes in *Gastrocnemius + Plantaris* (GP) and TA muscles was then determined. As expected, decreases in both α -skeletal actin (*Acta1*) and *Srf*, which is its own target gene, transcripts levels were observed in both denervated GP and TA (Fig 1B). Tallying with the reduced expression of *Srf* transcripts, a decrease in Srf protein content was detected in GP and TA upon denervation (Fig 1C). This decline in available Srf protein further participates to a low overall Srf transcriptional activity. Finally, the subcellular localization of Srf protein within myofibers was examined, as the intranuclear localization of Srf can participate to the control of Srf activity. Besides, an extranuclear localization of Srf has been reported in atrophied muscles from an intensive care unit rat model (Ochala et al., 2011). However, as depicted in figure S1A, Srf protein was localized inside myofiber nuclei in both contraateral and denervated muscles.

Tenotomy of the *Gastrocnemius* (Gas) tendon is a model of muscle atrophy relying on reduction of mechanical signals while maintaining the muscle innervated. In line with the results obtained upon denervation, the expression of Srf targets *Acta1* and *Srf* was significantly reduced in tenotomized Gas (Fig S1B), suggesting that the lack of mechanical signals rather than a trophic contribution of the nerve controls Srf activity.

Together, these results demonstrate that disuse muscle atrophy leads to a sustained decrease in Srf overall activity.

Modulation of Srf activity plays a functional role in denervation-induced atrophy.

To determine whether reduced Srf activity plays a functional role in denervation-induced muscle atrophy, the extent of the atrophy of *Srf*-deleted muscles following denervation was analyzed. We used HSA-Cre-ER^{T2}:Srf^{fllox/fllox} mutant mice (Lahoute et al., 2008) tamoxifen-injected to induce myofiber-specific Srf loss (Fig 2A). Seven days post-denervation, muscle weight and myofiber cross-sectional area (CSA)

measurements revealed that mutant mice displayed a higher atrophy of TA and GP muscles than control mice (Fig 2B-D). The greater muscle atrophy observed in mutant mice was not correlated to an increase in protein catabolic pathways, as the E3 ubiquitin ligases *MAFbx* and *MuRF1* transcripts were not differentially increased in the denervated muscles of control or mutant mice (Fig S2A). In muscles lacking *Srf*, *Acta1* transcripts levels were lower than in control denervated muscles, suggesting that the reduced expression of *Srf* target genes such as *Acta1* in mutant muscles could account for the increased atrophy (Fig S2B).

We then hypothesized that denervation-induced muscle atrophy could be counteracted by maintaining *Srf* activity. This was achieved by injecting control TA muscle with Adeno-Associated Viruses (AAV) driving the expression of a constitutively active *Srf* derivative, SRFVP16, prior to denervation (Fig 2E). AAV-SRFVP16 transduced over 80% of myofibers (Fig S2C) and SRFVP16 expression caused an increase in *Acta1* expression without affecting myofiber CSA in basal conditions (Fig 2G-I). One week after denervation, TA muscles expressing SRFVP16 displayed a significant resistance to atrophy assessed by muscle weight and myofiber CSA measurements (Fig 2F- H). Quantitative RT-PCR analysis for endogenous *Srf* and *Acta1* gene expression indicated that SRFVP16 overexpression led to the maintenance of *Srf* and *Acta1* transcripts levels following denervation (Fig 2I). In addition, attenuated atrophy was not correlated with a decreased expression of *MAFbx* and *MuRF1*, as their transcripts levels did not vary upon SRFVP16 expression (Fig S2D). These data show that artificial maintenance of *Srf* activity and therefore of *Srf* target genes expression levels is sufficient to minimize denervation-induced atrophy.

Altogether, these results demonstrate that *Srf* activity modulation plays a functional role during denervation-induced atrophy by downregulating the transcription level of its target genes, in particular those encoding sarcomeric proteins such as α -skeletal actin.

Srf is not implicated in caloric restriction-induced muscle atrophy.

We next speculated whether the modulation of *Srf* activity contributes to muscle atrophy triggered by different cues. Caloric restriction-induced muscle atrophy experiments were conducted on both control and *Srf* mutant mice for 7 days (Fig 3A). In contrast to what was observed in disuse, *Acta1* transcripts levels were not significantly lower in restricted compared to non-restricted mice, suggesting that *Srf* activity is not downregulated upon caloric restriction (Fig 3B). Consistent with these findings, muscle weight loss and decrease in myofiber CSA were similar between

control and *Srf*-deleted muscle (Fig 3C-E). In addition, *MAFbx* and *MuRF1* transcription was equally induced in control and mutant mice (Fig S3).

Taken together, these data show that *Srf* does not participate to caloric restriction-induced atrophy, indicating that the *Srf* contribution to atrophy revealed is specific to processes that involve a lack of mechanical load.

The actin/Mrtfs/Srf pathway regulates disuse muscle atrophy.

Two major signaling pathways activate *Srf*. The first is induced by mitogens and involves the phosphorylation of *Srf* cofactors from the Ets family by MAP kinases. The second pathway employs Rho GTPases, actin dynamics and the *Srf* coactivators Mrtfs whose nuclear accumulation is regulated by monomeric G-actin (Miralles et al., 2003). We hypothesized that the decrease in *Srf* activity in absence of mechanical signals could be due to a nuclear exclusion of Mrtfs. To examine Mrtfs localization *in vivo* during denervation-induced atrophy, TA muscles were electroporated with a Mrtf-A-GFP plasmid together with a pH2B-CFP plasmid to identify the electroporated fibers and mice were denervated 7 days after electroporation. Three days post-denervation immunostaining for GFP revealed two different subcellular localizations of Mrtf-A, intranuclear and perinuclear, among the electroporated myofibers (Fig 4A). When quantified in contralateral muscles, 32% of Mrtf-A-GFP+ myonuclei displayed an intranuclear localization of Mrtf-A-GFP and 68% perinuclear (Fig 4B). Strikingly, in denervated muscles, only 13% of myonuclei showed an intranuclear Mrtf-A-GFP localization, suggesting that denervation induces a shuttling of Mrtf-A from the myonuclei to the perinuclear region. This shuttling occurs rapidly as it is already visible 1 day post-denervation (Fig S4A). Significantly, endogenous Mrtf-A showed the same localizations (Fig S4B) as overexpressed Mrtf-A-GFP. Furthermore, in non-denervated muscles, the subcellular repartition of endogenous Mrtf-A and Mrtf-A-GFP were comparable (Fig S4C). Similarly, denervation-induced atrophy significantly reduced the proportion of intranuclear endogenous Mrtf-A.

To determine whether Mrtf-A nuclear exclusion is specific or not to mechanical load changes, Mrtf-A-GFP-electroporated mice were subjected to caloric restriction. In contrast to what was observed during denervation, there was no difference in the distribution of Mrtf-A-GFP in muscle from mice subjected to caloric restriction or fed normally (Fig 4C).

Mrtfs subcellular localization is regulated by monomeric G-actin, which inhibits entry in (Pawłowski et al., 2010) and stimulates export from the nuclei (Vartiainen et al., 2007). We hypothesized that alterations in G-actin quantity and/or localization

might contribute to nuclear exclusion of Mrtf-A and to Srf activity downregulation in denervated muscles. G-actin staining, revealed by fluorescent DNase I, was significantly higher in denervated muscles, 3 and 7 days post-denervation, and co-localized with DAPI (Fig 4D). In contrast, there was no difference in G-actin staining in muscle from calorie-restricted mice and that of control mice.

The functional role played by Mrtf-A nuclear shuttling during muscle atrophy was further investigated by overexpressing a constitutively active Mrtf-A derivative in which every actin binding site had been mutated (Mrtf-A XXX) (Guettler et al., 2008). When electroporated, Mrtf-A XXX remained exclusively inside myonuclei (Fig S4D). Significantly, whereas Mrtf-A XXX expression did not affect myofiber size in contralateral muscle, it conferred atrophy-resistance to denervated muscle (Fig 4E). In contrast, overexpression of Mrtf-A-GFP, which has wild type actin binding sites, did not affect myofiber size following denervation.

Mrtfs have been shown to interact with other transcription regulators, such as Smads and NFkB (Charbonney et al., 2011; Wang et al., 2012). In order to investigate whether the atrophy resistance given by active Mrtf-A requires Srf, Mrtf-A XXX was electroporated in muscles lacking Srf and the mice denervated. Seven days after denervation, *Srf*-deleted myofibers expressing Mrtf-A XXX showed the same atrophy as *Srf*-deleted myofibers which only express pH2B-CFP (Fig 4F), demonstrating that the resistance to denervation-induced atrophy conferred by Mrtf-A XXX overexpression in myofibers is dependent on Srf.

Altogether, these data show that the intranuclear / perinuclear shuttling of Mrtf-A is specific to disuse atrophy and that the artificial maintenance of Mrtf-A in the nucleus leads to an atrophy resistance reliant on Srf.

Discussion

This study reveals the actin/Mrtfs/Srf circuit as a key pathway whose downregulation specifically participates in skeletal muscle disuse atrophy. While Mrtf-A nuclear accumulation and overall Srf activity decrease upon denervation, they are not affected by caloric restriction. The similar extent of atrophy observed in control and *Srf*-deleted muscle during caloric restriction *versus* the aggravated atrophy observed in muscle lacking Srf following denervation corroborate the specific implication of Srf in disuse atrophy. Further evidence is given by using gain-of-function approaches in which either high Srf or Mrtfs activity in denervated myofibers was able to considerably counteract atrophy suggesting that, among Srf cofactors, Mrtfs are the main modulators of Srf activity in this system. Furthermore, this work demonstrates that the decreased overall Srf activity is a cause and not a consequence of lack of activity-induced muscle atrophy.

Biophysical stimuli that induce actin polymerization can directly activate Srf-dependent gene expression by reducing the amount of free G-actin, leading to Mrtfs nuclear accumulation (Mendez and Janmey, 2012). Here we provide the first *in vivo* data, in muscle tissue, showing an increase in nuclear G-actin content upon cessation of mechanical activity, associated with an exit of Mrtf-A from the nuclei and a decrease in Srf activity. To date, Mrtfs localization has only been investigated using cells in culture in which Mrtfs shuttles between cytoplasm and nucleus in response to various stimuli (Kawahara et al., 2010; Miralles et al., 2003). In this study, we show in muscle tissue that Mrtf-A is localized either in a perinuclear area or inside myofiber nuclei and is absent from the cytoplasm. Such a localization has not been observed in any cultured cell, including differentiated muscle cells (Herndon et al., 2013), and may be specific to mature myofibers constituting muscle tissue, which are highly specialized postmitotic plurinucleated cells whose cytoplasm is “filled” with sarcomeres. Moreover, upon mechanical activity arrest, we observe an increased G-actin content in myonuclei exclusively, which is consistent with a recent report showing a modulation of nuclear G-actin levels in muscles from insulin resistant mice and human (Jin et al., 2011). Nuclear G-actin accumulation could either be due to an import from the cytoplasm or result from a modulation of intranuclear actin polymerization. Recently, Baarlink and colleagues showed that formins polymerize actin inside the nucleus of cells in culture (Baarlink et al., 2013). We can thus speculate that nuclear actin assembly/disassembly could take place in myonuclei in response to mechanical cues, allowing G-actin content and Srf activity modulations to occur in the same compartment *in vivo*.

The comparison of gene expression in wasting processes induced by systemic diseases/cues and those induced by the elimination of contractile activity reveals genes whose modulation is common to all atrophy processes (atrogenes) and also genes whose modulation is specific to systemic or disuse atrophy (Sacheck et al., 2007). Surprisingly, there is little or no change in mRNAs for contractile proteins during systemic atrophy (Lecker et al., 2004) whereas these transcripts are downregulated in various disuse models in mice and human (Bialek et al., 2011; Giger et al., 2009; Lamon et al., 2009) suggesting a specific transcription program in absence of mechanical signals. Our results emphasize the importance of the transcriptional control of sarcomeric genes, such as *α-skeletal actin (Acta1)*, in disuse muscle atrophy. We propose that Srf participates in this control and we demonstrate a correlation between the level of *Acta1* transcripts, the activity of Srf and the extent of atrophy.

It is worth noting that, at the basal state, activation of the Mrtfs/Srf pathway (through SRFVP16 or Mrtf-A XXX overexpression) and blunting of Srf activity in muscles (through *Srf* deletion) do not change myofiber size. It appears that without activation of the signaling pathways triggering protein turnover, Srf activity does not contribute to myofiber size control despite its effect on the expression of target genes such as *Acta1*. It suggests that, during denervation, Srf activity decrease may contribute to amplifying the transcriptional atrophic program and may act in synergy with other pathways involved in protein catabolism.

In conclusion, we have identified the actin/Mrtfs/Srf circuit as a signaling pathway specifically regulated by mechanical signals in skeletal muscle. Bearing in mind the widely reported fact that physical activity declines in the elderly, the decreased expression of Srf in aged human and mouse muscles which could be a consequence of decreased activity as reported by ourselves and others (Lahoute et al., 2008; Sakuma et al., 2008), and that exercise training has been shown to improve physical functions of elder adults (Fiatarone et al., 1994), we suggest that an increase in mechanical cues through exercise could activate the actin/Mrtfs/Srf axis which could preserve muscle mass and ultimately contribute to an extended life span and a better quality of life.

Experimental Procedures

Mouse protocols

Mice homozygous for Srf floxed alleles ($Srf^{flox/flox}$) and HSA-Cre-ER^{T2}: $Srf^{flox/flox}$ tamoxifen-dependent Cre recombinase mice have been previously described (Lahoute et al., 2008). In all experiments, 2-month-old HSA-Cre-ER^{T2}: $Srf^{flox/flox}$ and $Srf^{flox/flox}$ males were given 4 intraperitoneal tamoxifen injections (1 mg per day; Sigma) and are referred as mutant and control mice respectively.

Denervation was performed by surgically exposing the sciatic nerve of the left leg and cutting a 3-mm-long nerve section. The right leg, called contralateral, was left intact and used as an internal control. Mice were sacrificed after 1, 3 or 7 days.

To perform caloric restriction, mice were placed in individual cages and fed with regular food *ad libitum*. During the acclimation week, mice were weighed daily and food intake was measured to determine the average amount of food consumed daily by each mouse. Then, mice were randomly separated in a control and a restricted group. Everyday, the restricted group received 50% of the daily amount consumed by the same mouse during the week of acclimation. Mice were sacrificed after 3 or 7 days.

Tenotomy was performed by cutting the tendons of Gas and *Soleus* muscles of the left leg. The TA muscle from the left leg was used as an internal control. In addition, Gas and TA muscles from the right leg, which was left intact, were used as internal controls. Mice were sacrificed after 7 days.

Gene electrotransfer was performed as described (Guerci et al., 2012). TA muscles were injected with the indicated plasmids: 1 μ g MRTFA-GFP + 3 μ g pH2B-CFP + 5 μ g empty vector (Ef) or 10 μ g MRTF XXX + 3 μ g pH2B-CFP or 5 μ g 3DA-luciferase + 2 μ g TK Renilla + 5 μ g empty vector (Ef). Mice were denervated or submitted to caloric restriction 7 days after gene delivery. For reporter assays, Firefly and *Renilla* luciferase activities were determined using the Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega).

Adeno-Associated Viruses particles encoding SRFVP16 (AAV-SRFVP16) were produced as described (Guerci et al., 2012). AAV transduction was performed by injecting TA muscle with $1,87 \times 10^{10}$ viral AAV genomes. Mice were given a 2-weeks recovery period allowing expression before performing denervation.

All experiments were conducted in accordance with European guidelines for the care and use of laboratory animals and were approved by the institutional animal care and use committee.

Plasmids

Srf-luciferase reporter construct (3DA-luciferase) is described in (Geneste et al., 2002). TK-*Renilla* plasmid (Promega) was used as a gene transfer efficiency control in luciferase reporter assays. Plasmid pH2B-CFP encodes Histone 2B-CFP fusion (Abgene). Mrtf-A derivatives Mrtf-A XXX and Mrtf-A-GFP are described in (Guettler et al., 2008; Vartiainen et al., 2007) respectively.

Western Blot Analysis

Western blotting was performed as previously described (Lahoute et al., 2008). Immunoblots were hybridized with anti-Srf antibody (Santa Cruz). Immunoreactivity was detected by ECL and protein bands were analyzed by Biorad Quantity One software, version 4.6.6.

RNA extraction and qRT-PCR

Total RNA was isolated using TRIzol reagent (Invitrogen) and reverse-transcribed using M-MLV reverse transcriptase and random hexamers (Invitrogen). Quantitative PCR analysis was performed using a LightCycler 480 instrument (Roche) with LightCycler 480 SYBR Green I Master kit (Roche). Values were normalized with *Hydroxymethylbilane synthase (Hmbs)*. The following primers were used (5'-3'): Acta1 (F: CTGAGCGCAAGTACTCAGTGTGGA; R: TTCCAAAACAGGCGCCGGCTGCA), Hmbs (F: TGCACGATCCTGAAACTCTG; R: TGCATGCTATCTGAGCCATC), MAFbx (F: TGTGGGTGTATCGGATGGAGA; R: CTGCATGATGTTTCAGTTGTAAGC), MuRF1 (F: GAATAGCATCCAGATCAGCAG; R: GAGAATGTGGCAGTGTGTTGCA), Srf (F: CACCTACCAGGTGTCGGAAT; R: GCTGTGTGGATTGTGGAGGT), VP16 (F: TCGATCTGGACATGTTGGGGG; R: GGTAACATCTGCTCAAACCTC).

Immunostaining

TA muscles were frozen in cooled isopentane and cut in 8µm-thick sections. Cryosections were fixed in 4% paraformaldehyde for 8 min. The samples were then saturated overnight in 5% goat serum (GS), 4% bovine serum albumin (BSA) and 0.2% triton X-100 in PBS at 4°C. Primary antibodies were diluted in 5% GS, 4% BSA and 0.1% triton X-100 PBS and incubated overnight at 4°C. All cryosections were counterstained with DAPI. When Mrtf-A-GFP was overexpressed, TA muscles were prefixed in 4% paraformaldehyde for 2h at 4°C, washed with PBS and incubated overnight in 40% sucrose before freezing. The following primary antibodies against Srf (Santa Cruz), Dystrophin (Novocastra), VP16 (Abcam), Mrtf-A (Santa Cruz),

Laminin $\alpha 2$ (Abcam), GFP (Abcam), HA (Roche) were used. For G-actin staining, Texas Red-conjugated DNase I was used following manufacturer's protocol (Molecular Probes). For quantification of Mrtf-A-GFP subcellular distribution, myonuclei expressing both Mrtf-A-GFP and pH2B-CFP were considered.

Image acquisition

Image acquisition was performed in the Cochin Imaging Facility. Digital images were acquired using a microscope (Zeiss Axiovert 200M) with 10X magnification, cooled CCD CoolSNAP HQ camera (Photometrics) and Metamorph (Molecular Devices). Alternatively, images were taken using a confocal microscope (spinning disk Leica Yokogawa CSU-X1M1) with 63X magnification, a CoolSNAP HQ2 camera (Photometrics) and Metamorph (Molecular Devices). Images were taken at room temperature and the imaging medium was from Dako. Images were composed and edited in Photoshop (Adobe) and in ImageJ (NIH). Background was reduced using brightness and contrast adjustments and these settings were applied to the whole image.

Morphometric analyses

Fiber mean cross-sectional area (CSA) was analyzed by immunostaining using anti-dystrophin. For electroporated TA, only pH2B-CFP, HA or GFP positive fiber CSA were analyzed. For each muscle, CSA was determined using Metamorph Offline software (version 7.0r4).

Statistical analysis

Results are expressed as mean \pm SEM. The significance of differences between means was assessed with Student's t test. P values of <0.05 were considered statistically significant.

Acknowledgements

We thank R. Treisman for providing materials. We are grateful to V. Randrianarison, P. Maire, C. Desdouets, L. Dandolo, J.P. Concordet, D. Coletti, R. Mounier and R. Jaspers for critical reading of the manuscript. This work was supported by grants from AFM (13523) and from ANR (JC08-327703).

References

- Baarlink, C., Wang, H., and Grosse, R. (2013). Nuclear Actin Network Assembly by Formins Regulates the SRF Coactivator MAL. *Science*. Published online April 4, 2013. 10.1126/science.1235038
- Bialek, P., Morris, C., Parkington, J., St Andre, M., Owens, J., Yaworsky, P., Seeherman, H., and Jelinsky, S.A. (2011). Distinct protein degradation profiles are induced by different disuse models of skeletal muscle atrophy. *Physiol Genomics* 43, 1075-1086.
- Bonaldo, P., and Sandri, M. (2013). Cellular and molecular mechanisms of muscle atrophy. *Dis Model Mech* 6, 25-39.
- Charbonney, E., Speight, P., Masszi, A., Nakano, H., and Kapus, A. (2011). beta-catenin and Smad3 regulate the activity and stability of myocardin-related transcription factor during epithelial-myofibroblast transition. *Mol Biol Cell* 22, 4472-4485.
- Clarke, B.A., Drujan, D., Willis, M.S., Murphy, L.O., Corpina, R.A., Burova, E., Rakhilin, S.V., Stitt, T.N., Patterson, C., Latres, E., *et al.* (2007). The E3 Ligase MuRF1 degrades myosin heavy chain protein in dexamethasone-treated skeletal muscle. *Cell Metab* 6, 376-385.
- Cohen, S., Brault, J.J., Gygi, S.P., Glass, D.J., Valenzuela, D.M., Gartner, C., Latres, E., and Goldberg, A.L. (2009). During muscle atrophy, thick, but not thin, filament components are degraded by MuRF1-dependent ubiquitylation. *J Cell Biol* 185, 1083-1095.
- Cohen, S., Zhai, B., Gygi, S.P., and Goldberg, A.L. (2012). Ubiquitylation by Trim32 causes coupled loss of desmin, Z-bands, and thin filaments in muscle atrophy. *J Cell Biol* 198, 575-589.
- Fiatarone, M.A., O'Neill, E.F., Ryan, N.D., Clements, K.M., Solares, G.R., Nelson, M.E., Roberts, S.B., Kehayias, J.J., Lipsitz, L.A., and Evans, W.J. (1994). Exercise training and nutritional supplementation for physical frailty in very elderly people. *N Engl J Med* 330, 1769-1775.
- Geneste O, Copeland JW, & Treisman R (2002) LIM kinase and Diaphanous cooperate to regulate serum response factor and actin dynamics. *J Cell Biol* 157(5):831-838.
- Giger, J.M., Bodell, P.W., Zeng, M., Baldwin, K.M., and Haddad, F. (2009). Rapid muscle atrophy response to unloading: pretranslational processes involving MHC and actin. *J Appl Physiol* 107, 1204-1212.

Guerci, A., Lahoute, C., Hebrard, S., Collard, L., Graindorge, D., Favier, M., Cagnard, N., Batonnet-Pichon, S., Precigout, G., Garcia, L., *et al.* (2012). Srf-dependent paracrine signals produced by myofibers control satellite cell-mediated skeletal muscle hypertrophy. *Cell Metab* 15, 25-37.

Guettler, S., Vartiainen, M.K., Miralles, F., Larijani, B., and Treisman, R. (2008). RPEL motifs link the serum response factor cofactor MAL but not myocardin to Rho signaling via actin binding. *Mol Cell Biol* 28, 732-742.

Herndon, C.A., Ankenbruck, N., Lester, B., Bailey, J., and Fromm, L. (2013). Neuregulin1 signaling targets SRF and CREB and activates the muscle spindle-specific gene *Egr3* through a composite SRF-CREB-binding site. *Exp Cell Res* 319, 718-730.

Jin, W., Goldfine, A.B., Boes, T., Henry, R.R., Ciaraldi, T.P., Kim, E.Y., Emecan, M., Fitzpatrick, C., Sen, A., Shah, A., *et al.* (2011). Increased SRF transcriptional activity in human and mouse skeletal muscle is a signature of insulin resistance. *J Clin Invest* 121, 918-929.

Kuwahara, K., Kinoshita, H., Kuwabara, Y., Nakagawa, Y., Usami, S., Minami, T., Yamada, Y., Fujiwara, M., and Nakao, K. (2010). Myocardin-related transcription factor A is a common mediator of mechanical stress- and neurohumoral stimulation-induced cardiac hypertrophic signaling leading to activation of brain natriuretic peptide gene expression. *Mol Cell Biol* 30, 4134-4148.

Lahoute, C., Sotiropoulos, A., Favier, M., Guillet-Deniau, I., Charvet, C., Ferry, A., Butler-Browne, G., Metzger, D., Tuil, D., and Daegelen, D. (2008). Premature aging in skeletal muscle lacking serum response factor. *PLoS One* 3, e3910.

Lamon, S., Wallace, M.A., Leger, B., and Russell, A.P. (2009). Regulation of STARS and its downstream targets suggest a novel pathway involved in human skeletal muscle hypertrophy and atrophy. *J Physiol* 587, 1795-1803.

Lecker, S.H., Jagoe, R.T., Gilbert, A., Gomes, M., Baracos, V., Bailey, J., Price, S.R., Mitch, W.E., and Goldberg, A.L. (2004). Multiple types of skeletal muscle atrophy involve a common program of changes in gene expression. *FASEB J* 18, 39-51.

Mendez, M.G., and Janmey, P.A. (2012). Transcription factor regulation by mechanical stress. *Int J Biochem Cell Biol* 44, 728-732.

Miralles, F., Posern, G., Zaromytidou, A.I., and Treisman, R. (2003). Actin dynamics control SRF activity by regulation of its coactivator MAL. *Cell* 113, 329-342.

Ochala, J., Gustafson, A.M., Diez, M.L., Renaud, G., Li, M., Aare, S., Qaisar, R., Banduseela, V.C., Hedstrom, Y., Tang, X., *et al.* (2011). Preferential skeletal muscle myosin loss in response to mechanical silencing in a novel rat intensive care unit model: underlying mechanisms. *J Physiol* 589, 2007-2026.

Pawlowski, R., Rajakyla, E.K., Vartiainen, M.K., and Treisman, R. (2010). An actin-regulated importin alpha/beta-dependent extended bipartite NLS directs nuclear import of MRTF-A. *EMBO J* 29, 3448-3458.

Pipes, G.C., Creemers, E.E., and Olson, E.N. (2006). The myocardin family of transcriptional coactivators: versatile regulators of cell growth, migration, and myogenesis. *Genes Dev* 20, 1545-1556.

Polge, C., Heng, A.E., Jarzaguet, M., Ventadour, S., Claustre, A., Combaret, L., Bechet, D., Matondo, M., Uttenweiler-Joseph, S., Monsarrat, B., *et al.* (2011). Muscle actin is polyubiquitinated in vitro and in vivo and targeted for breakdown by the E3 ligase MuRF1. *FASEB J* 25, 3790-3802.

Posern, G., and Treisman, R. (2006). Actin' together: serum response factor, its cofactors and the link to signal transduction. *Trends Cell Biol* 16, 588-596.

Sacheck, J.M., Hyatt, J.P., Raffaello, A., Jagoe, R.T., Roy, R.R., Edgerton, V.R., Lecker, S.H., and Goldberg, A.L. (2007). Rapid disuse and denervation atrophy involve transcriptional changes similar to those of muscle wasting during systemic diseases. *FASEB J* 21, 140-155.

Sakuma, K., Akiho, M., Nakashima, H., Akima, H., and Yasuhara, M. (2008). Age-related reductions in expression of serum response factor and myocardin-related transcription factor A in mouse skeletal muscles. *Biochim Biophys Acta* 1782, 453-461.

Vartiainen, M.K., Guettler, S., Larijani, B., and Treisman, R. (2007). Nuclear actin regulates dynamic subcellular localization and activity of the SRF cofactor MAL. *Science* 316, 1749-1752.

Wang, D., Prakash, J., Nguyen, P., Davis-Dusenbery, B.N., Hill, N.S., Layne, M.D., Hata, A., and Lagna, G. (2012). Bone morphogenetic protein signaling in vascular disease: anti-inflammatory action through myocardin-related transcription factor A. *J Biol Chem* 287, 28067-28077.

Figure legends

Figure 1

Srf activity decreases upon denervation-induced atrophy. (A) Responsiveness of Srf reporter construct consisting in 3 CArG upstream luciferase gene (3DA) in contralateral and denervated TA of control mice, 7 days post-denervation (n=3 per group). *, p<0.05 (B) Expression of *Srf* and *Acta1* in contralateral and denervated GP and TA of control mice, 7 days post-denervation (n=4 per group). Data (mean ± SEM) are normalized by *Hmbs* expression and presented as fold-induction relative to contralateral muscles. *, p<0.05 (C) Representative Western blot for Srf and Ponceau (upper panel) and fold change in Srf protein level in GP and TA muscles of control mice (lower panel), 7 days post-denervation (n=4 per group). Quantification data (mean ± SEM) are normalized by Ponceau and presented as fold-induction relative to contralateral muscles. *, p<0.05

Figure 2

Modulation of Srf activity plays a functional role in denervation-induced atrophy. (A) Control and Srf mutant mice were injected with tamoxifen 14 days prior to denervation procedure of one leg. Muscles were isolated 7 days post-denervation. (B) Ratio of denervated muscle weight to contralateral muscle weight for TA and GP of control and mutant mice, 7 days post-denervation (n=10 per group). Data are mean ± SEM. *, p<0.05 (C) Dystrophin immunostaining of contralateral and denervated TA of control and mutant mice, 7 days post-denervation, marking myofiber sarcolemma. (Scale bar, 100µm) (D) Mean CSA (± SEM) of muscle fibers to body weight for denervated and contralateral TA in control and mutant mice, 7 days post-denervation (between 1000 and 1500 myofibers were analyzed per muscle of n=4 mice). *, p<0.05 versus control TA (-); §, p<0.05 versus mutant TA (-); #, p<0.05 versus control TA (+) (E) TA muscles from one leg of control mice were injected or not with AAV-SRFVP16 14 days prior to denervation procedure of the same leg. Muscles were isolated 7 days post-denervation. (F) Ratio of denervated muscle weight to contralateral muscle weight for TA, injected or not with AAV-SRFVP16, 7 days post-denervation (n=6 per group). Data are mean ± SEM. *, p<0.05 (G) Dystrophin immunostaining of contralateral and denervated TA, injected or not with AAV-SRFVP16, 7 days post-denervation. (Scale bar, 100µm) (H) Mean CSA (± SEM) of muscle fibers to body weight in denervated and contralateral TA, injected or not with AAV-SRFVP16, 7 days post-denervation (between 1000 and 1500 myofibers were analyzed per muscle of n=4 mice). *, p<0.05 versus non-injected TA (-); #, p<0.05 versus non-injected TA (+) (I) Expression of endogenous

Srf, *Acta1* and *VP16* in contralateral and denervated TA, injected or not with AAV-SRFVP16, 7 days post-denervation (n=4 per group). Data (mean \pm SEM) are normalized by *Hmbs* expression and presented as fold-induction relative to non-injected contralateral TA. *, p<0.05 versus non-injected TA (-); §, p<0.05 versus injected TA (-)

Figure 3

Srf is not implicated in caloric restriction-induced muscle atrophy. (A) Control and mutant mice were injected with tamoxifen 14 days prior to caloric restriction. Muscles were isolated after 7 days of caloric restriction. (B) Expression of *Srf* and *Acta1* in GP of control mice submitted to 7 days of caloric restriction or fed *ad libitum* (n=4 per group). Data (mean \pm SEM) are normalized by *Hmbs* expression and presented as fold-induction relative to muscles from non-restricted mice. *, p<0.05 (C) Ratio of GP weight to body weight of control and mutant mice, after 7 days of caloric restriction (n=5 per group). Data are mean \pm SEM. (D) Dystrophin immunostaining of restricted and non-restricted mice TA of control and mutant mice, after 7 days of caloric restriction. (Scale bar, 100 μ m) (E) Mean CSA (\pm SEM) of restricted and non-restricted mice TA muscle fibers to body weight for control and mutant mice, after 7 days of caloric restriction (between 1000 and 1500 myofibers were analyzed per muscle of n=4 mice). *, p<0.05 versus control TA (-); §, p<0.05 versus mutant TA (-)

Figure 4

The actin/Mrtfs/Srf pathway regulates disuse muscle atrophy. (A) Intranuclear or perinuclear localization of Mrtf-A-GFP observed after the electroporation of a Mrtf-A-GFP plasmid in TA of control mice revealed by immunostaining of GFP and dystrophin. (Scale bar, 5 μ m) (B) Proportion of nuclei displaying intranuclear or perinuclear Mrtf-A-GFP in contralateral and denervated TA of control mice, 3 days post-denervation (at least 250 nuclei were analyzed per muscle from at least n=4 mice). Data are mean \pm SEM. *, p<0.05 versus intranuclear Mrtf-A-GFP (-); §, p<0.05 versus perinuclear Mrtf-A-GFP (-) (C) Proportion of nuclei displaying intranuclear or perinuclear Mrtf-A-GFP in TA from restricted and non-restricted mice, after 3 days of caloric restriction (at least 250 nuclei were analyzed per muscle from at least n=4 mice). Data are mean \pm SEM. NS, non significant (D) G-actin (DNase I, Texas red) and dystrophin staining on contralateral, 3 or 7 days post-denervation or 7 days post-caloric restriction TA muscles. (Scale bar, 10 μ m) (E) Mean CSA (\pm SEM) of muscle fibers to body weight for denervated and contralateral TA, injected or not with Mrtf-A

XXX or Mrtf-A-GFP, in control mice, 7 days post-denervation (at least 30 myofibers were analyzed per muscle from at least n=4 mice). *, p<0.05 versus non-electroporated TA (-); §, p<0.05 versus Mrtf-A-GFP-electroporated TA (-) (F) Mean CSA (\pm SEM) of *Srf*-deleted muscle fibers to body weight for denervated and contralateral TA, injected or not with Mrtf-A XXX, 7 days post-denervation (at least 30 myofibers were analyzed per muscle from at least n=4 mice). *, p<0.05 versus non-electroporated TA (-); §, p<0.05 versus Mrtf-A XXX-electroporated TA (-)

Figure S1

(A) *Srf* and Laminin α 2 immunostaining of contralateral and denervated TA of control mice, 7 days post-denervation. (Scale bar, 15 μ m) (B) Ratio of tenotomized muscle weight to contralateral muscle weight for Gas and non-tenotomized TA of control mice, 7 days post-tenotomy (n=5 per group), and expression of *Srf* and *Acta1* in Gas and non-tenotomized TA, 7 days post-tenotomy (n=5 per group). Data (mean \pm SEM) are normalized by *Hmbs* expression and presented as fold-induction relative to contralateral muscles. *, p<0.05

Figure S2

(A) Expression of *MAFbx* and *MuRF1* in contralateral and denervated TA of control and mutant mice, 7 days post-denervation (n=4 per group). Data (mean \pm SEM) are normalized by *Hmbs* expression and presented as fold-induction relative to contralateral muscles from control mice. *, p<0.05 versus control TA or GP (-); §, p<0.05 versus mutant TA or GP (-) (B) Expression of *Srf* and *Acta1* in contralateral and denervated TA of control and mutant mice, 7 days post-denervation (n=4 per group). Data (mean \pm SEM) are normalized by *Hmbs* expression and presented as fold-induction relative to contralateral TA from control mice. *, p<0.05 versus control TA (-); §, p<0.05 versus mutant TA (-) (C) VP16 immunostaining of denervated TA, injected with AAV-SRFVP16, 7 days post-denervation. (Scale bar, 50 μ m) (D) Expression of *MAFbx* and *MuRF1* in contralateral and denervated TA, injected or not with AAV-SRFVP16, 7 days post-denervation (n=4 per group). Data (mean \pm SEM) are normalized by *Hmbs* expression and presented as fold-induction relative to non-injected contralateral TA. *, p<0.05 versus non-injected TA (-); §, p<0.05 versus injected TA (-)

Figure S3

Expression of *MAFbx* and *MuRF1* in GP from control and mutant mice subjected to 7 days of caloric restriction or fed *ad libitum* (n=4 per group). Data (mean \pm SEM) are

normalized by *Hmbs* expression and presented as fold-induction relative to muscles from non-restricted control mice. *, $p < 0.05$ versus control GP (-); §, $p < 0.05$ versus mutant GP (-)

Figure S4

(A) Quantity of intranuclear Mrtf-A-GFP in contralateral and denervated TA of control mice, 1 or 3 days post-denervation (n=3 per group). Values are normalized by contralateral TA. *, $p < 0.05$ (B) Intranuclear or perinuclear endogenous Mrtf-A localization in TA of control mice revealed by immunostaining of Mrtf-A and dystrophin. (Scale bar, 5 μm) (C) Proportion of nuclei displaying intranuclear or perinuclear endogenous Mrtf-A in contralateral and denervated TA of control mice, 7 days post-denervation (n=4 per group). *, $p < 0.05$ versus intranuclear Mrtf-A (-); §, $p < 0.05$ versus perinuclear Mrtf-A (-) (D) HA and dystrophin immunostaining of denervated TA electroporated with HA-tagged Mrtf-A XXX, 7 days post-denervation, showing the 100% intranuclear localization of Mrtf-A XXX. (Scale bar, 5 μm)

Figure 1

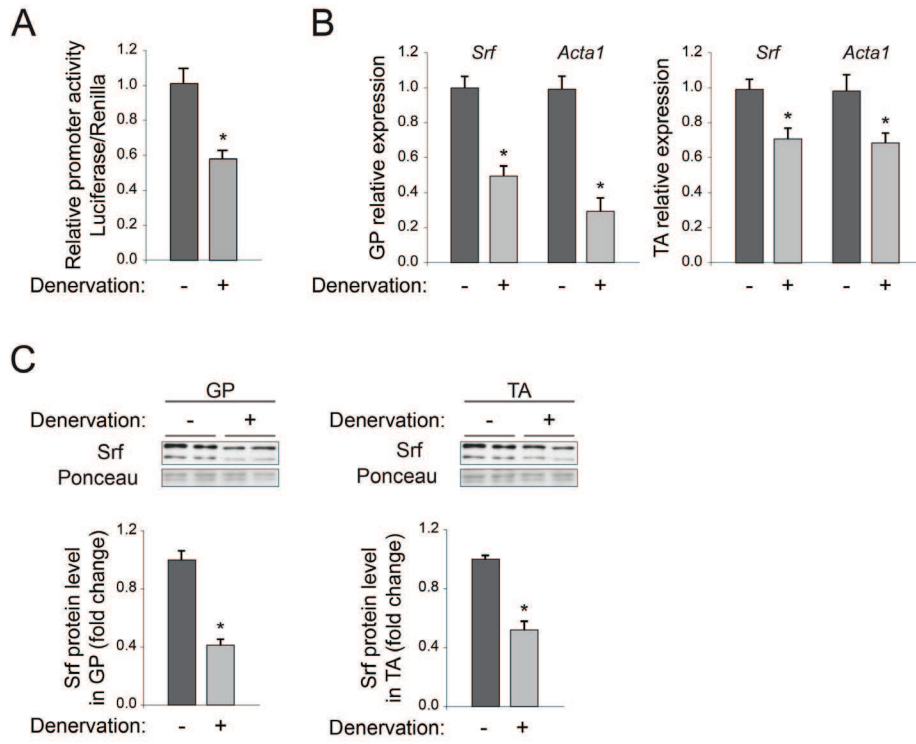


Figure 2

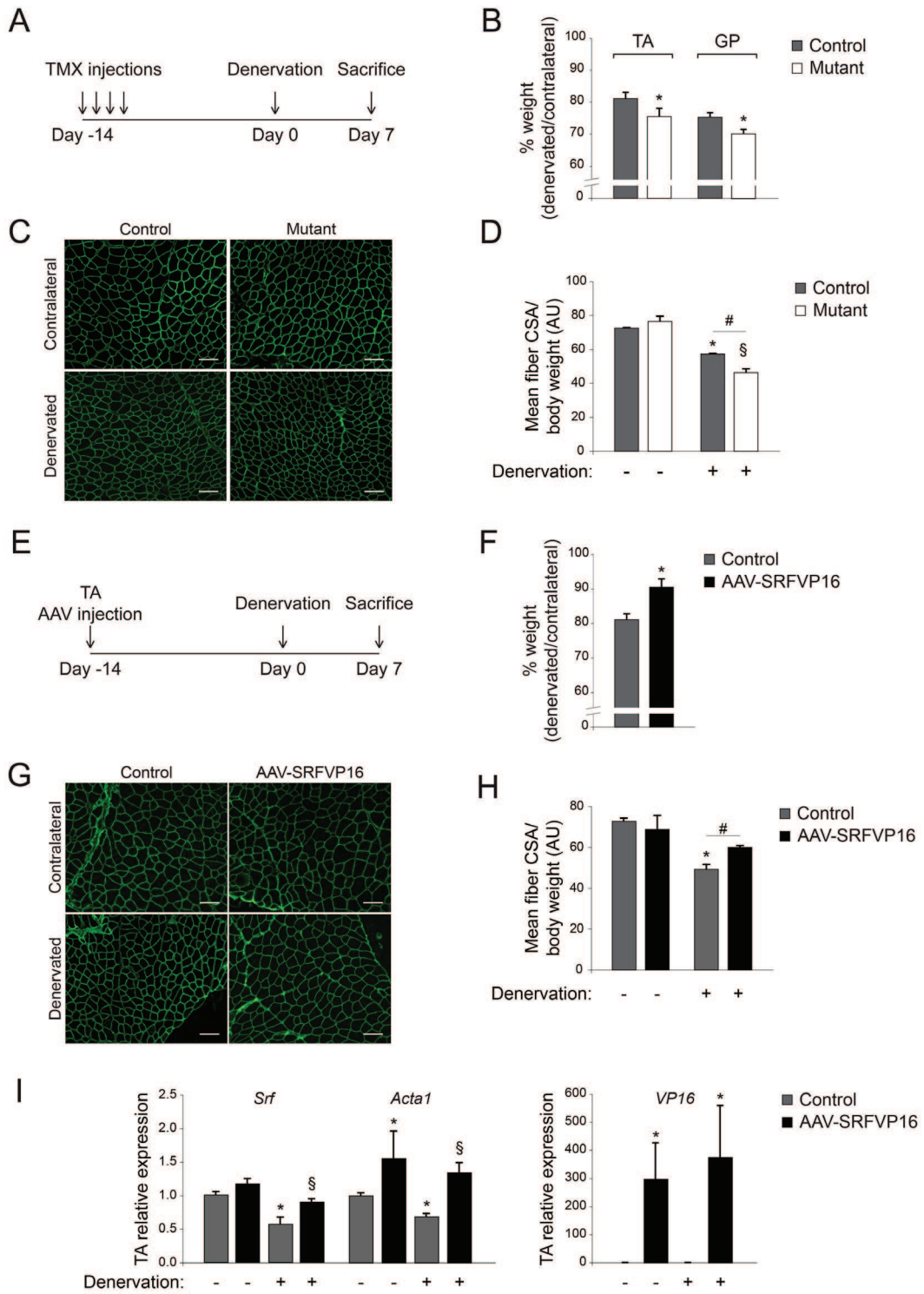


Figure 3

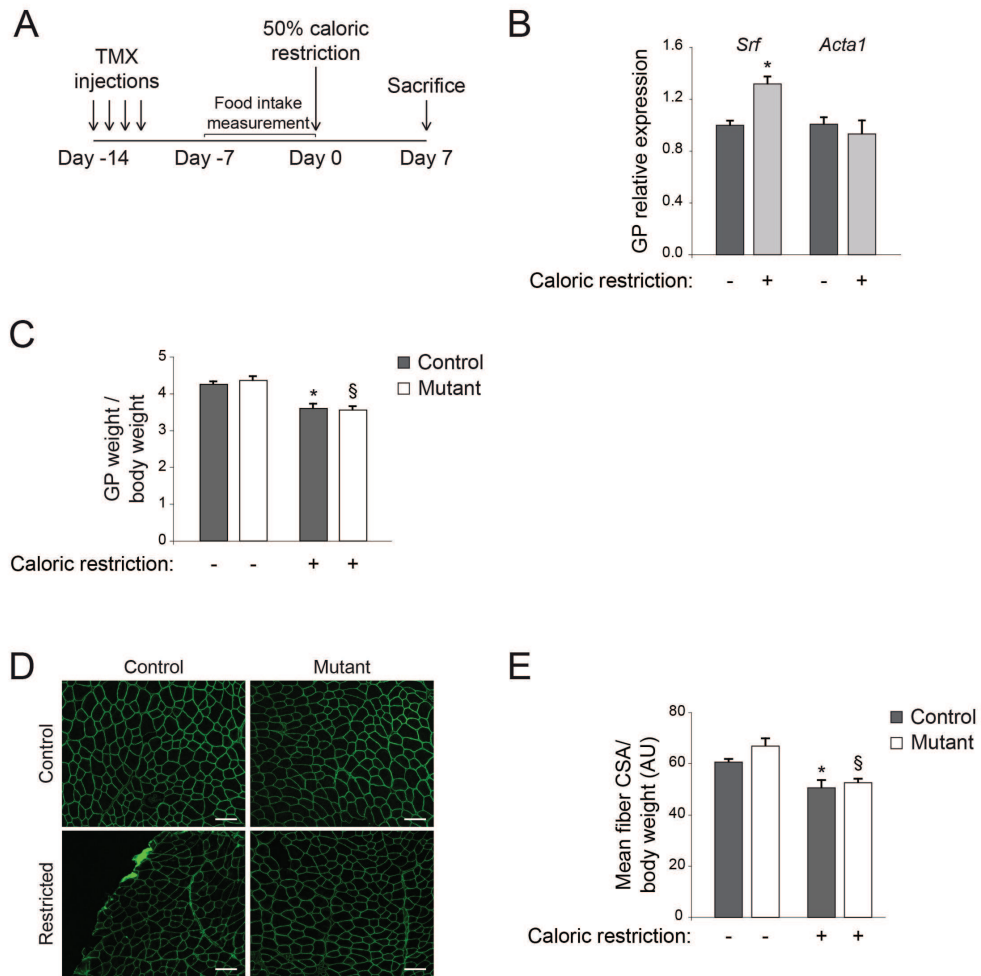


Figure 4

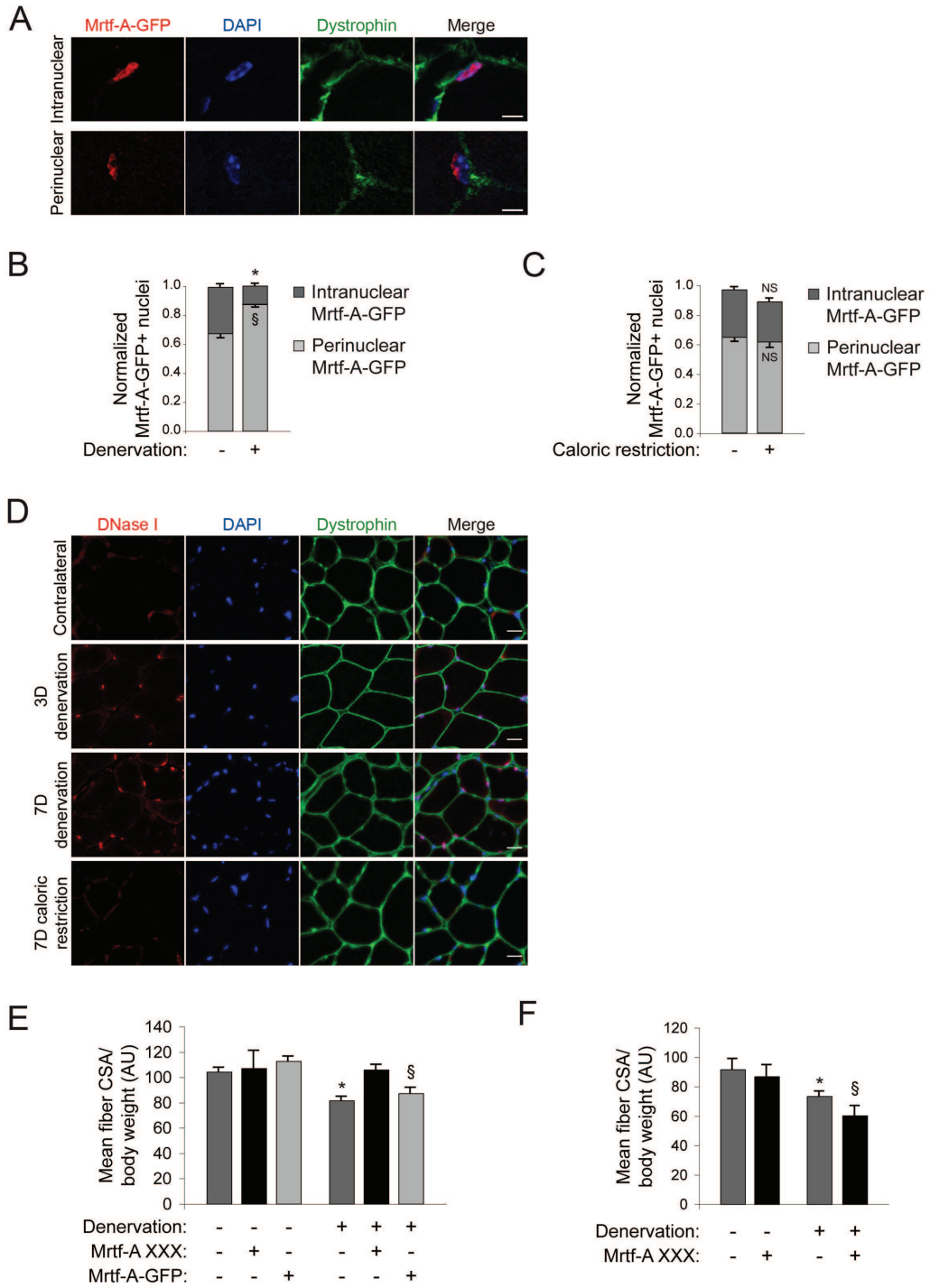


Figure S1

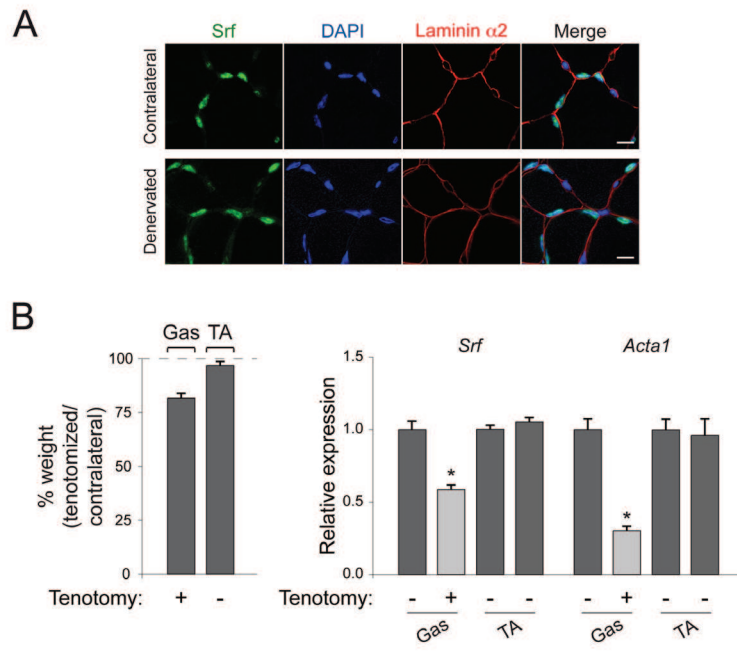


Figure S2

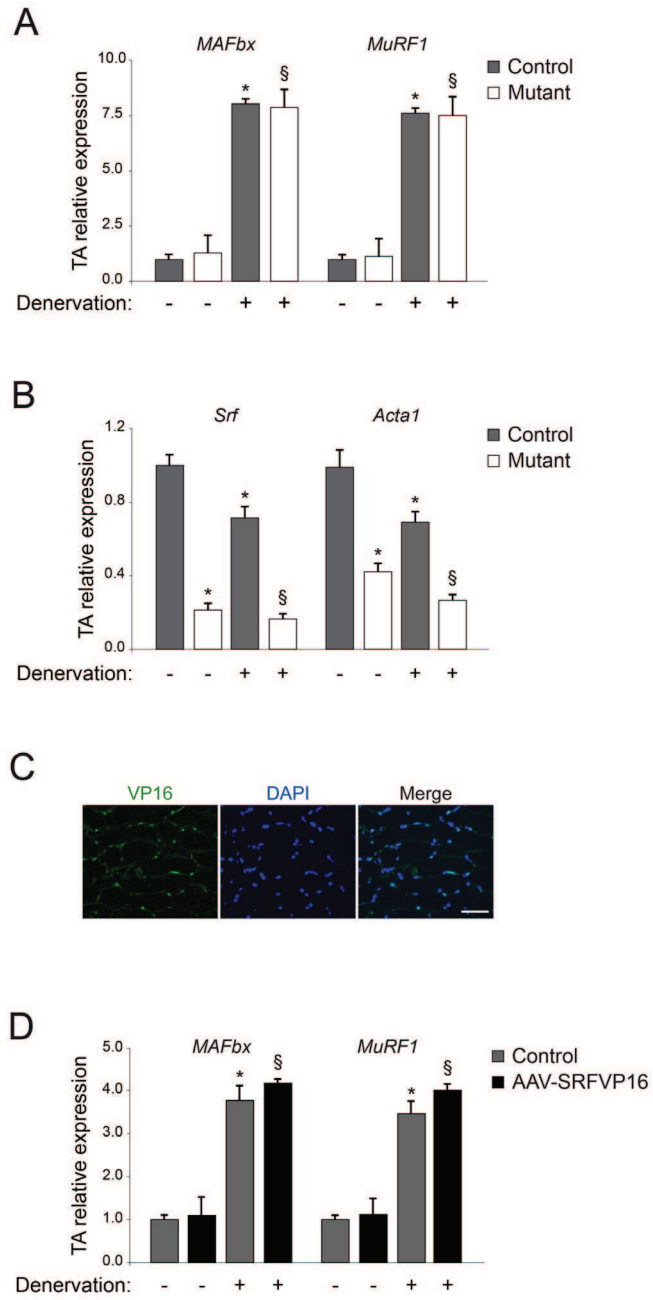


Figure S3

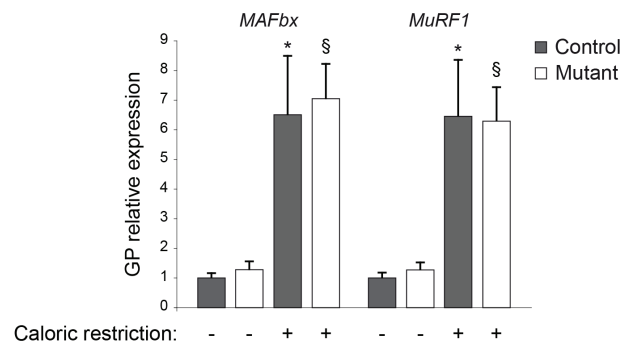
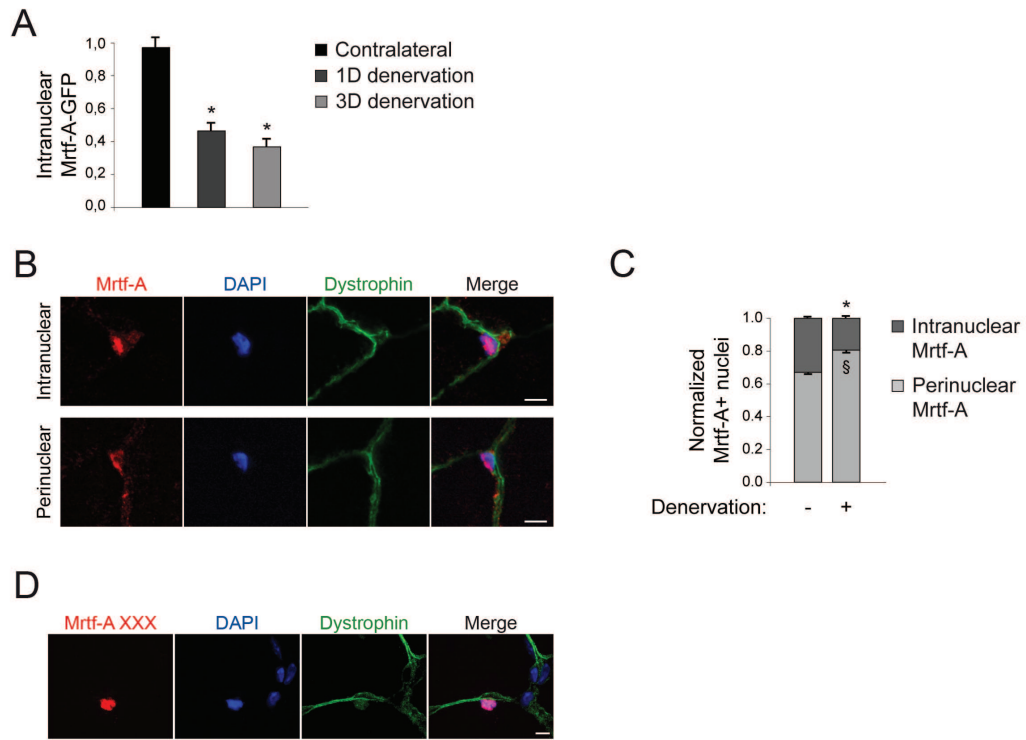


Figure S4



2. Conclusions principales

Le résultat principal de cette étude est la mise en évidence du rôle de Srf en tant que médiateur de la mécano-transduction dans le tissu musculaire et de l'implication spécifique de la voie actine/Mrtfs/Srf au cours de l'atrophie induite par arrêt de l'activité mécanique.

En premier lieu, j'ai montré que, 7 jours après dénervation, l'activité transcriptionnelle de Srf est réduite dans les TA et les *Gastrocnemius* et *Plantaris* (GP) dénervés. En conséquence, l'expression des gènes cibles de Srf est altérée : la quantité de transcrits des gènes codant pour l' α -actine squelettique (*Acta1*) et pour Srf lui-même diminue dans ces muscles. Cette diminution est accompagnée par une baisse de la quantité de protéines Srf, maintenant une activité transcriptionnelle de Srf réduite (Figure 1 de l'article).

En second lieu, grâce à des approches de perte et de gain de fonction, j'ai montré que la modulation de l'activité de Srf joue un rôle fonctionnel dans l'atrophie induite par arrêt de l'activité. L'atrophie musculaire provoquée par la dénervation est en effet aggravée dans des muscles dépourvus de Srf (modèle de KO conditionnel et inductible de Srf). Au contraire, lorsque des muscles expriment une forme constitutivement active de Srf (injection dans le TA d'Adeno-Associated Viruses AAV-SRFVP16), ils deviennent résistants à l'atrophie musculaire induite par dénervation (Figure 2 de l'article).

Afin de déterminer si la contribution de Srf à l'atrophie musculaire est spécifique du manque d'activité mécanique, j'ai soumis des souris contrôles et mutantes à un protocole d'atrophie musculaire n'entraînant pas de perte d'activité, la restriction calorique. Après une semaine de restriction, les souris contrôles et mutantes présentent la même atrophie, indiquant que Srf n'est pas impliqué dans ce type d'atrophie (Figure 3 de l'article).

Enfin, je me suis intéressée au mécanisme régulant l'activité de Srf dans l'atrophie musculaire induite par arrêt de l'activité mécanique. J'ai pu démontrer que, contrairement à la restriction calorique, la dénervation entraîne une accumulation d'actine monomérique dans le noyau des fibres et une délocalisation de Mrtf-A du noyau vers un espace péri-nucléaire. Par ailleurs, l'électroporation *in vivo* d'une forme constitutivement nucléaire de Mrtf-A confère aux fibres électroporées une résistance à l'atrophie induite par dénervation. La répétition de cette expérience sur des souris mutantes m'a permis de démontrer que cette résistance à l'atrophie, acquise par le maintien artificiel de Mrtf-A dans le noyau, requiert Srf (Figure 4 de l'article). Le modèle que nous proposons dans l'article est le suivant : la suppression

de l'activité musculaire induit une accumulation d'actine monomérique dans le noyau des fibres qui entraîne une délocalisation de Mrtf-A, elle-même provoquant une chute de l'activité transcriptionnelle de Srf ; la diminution de la transcription des cibles de Srf, notamment d'*Acta1*, ainsi engendrée participerait à l'atrophie musculaire.

3. Résultats complémentaires

a. Implication de Srf dans l'atrophie induite par immobilisation

Dans l'article, nous décrivons une diminution de l'activité de Srf avec la dénervation (Figure 1 de l'article) et la ténotomie (Figure S1 de l'article). Nous avons également soumis des souris contrôles et mutantes à un protocole d'atrophie par immobilisation, en agrafant leur patte arrière gauche comme décrit précédemment (Caron et al., 2009). Comme dans le cas de la dénervation et de la ténotomie, l'immobilisation entraîne une diminution de la quantité de transcrits d'*Acta1* et de *Srf* après 7 jours (Figure 27A). De plus, l'atrophie des muscles immobilisés est aggravée chez les souris mutantes, confirmant les résultats obtenus pour la dénervation (Figure 27B et Figure 2B de l'article).

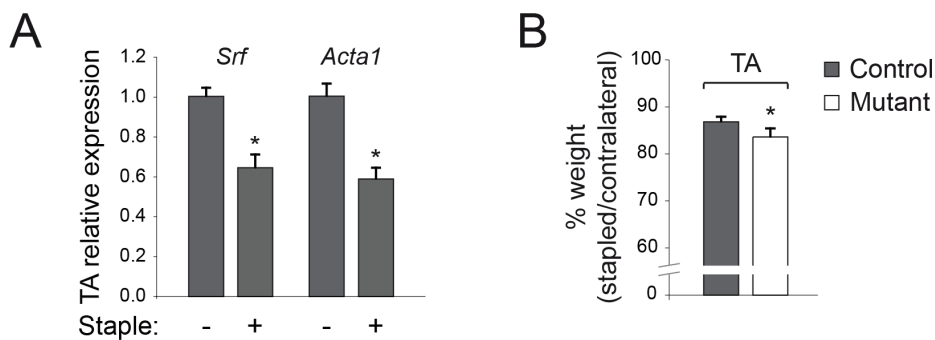


Figure 27 : l'immobilisation réduit l'activité de Srf et l'atrophie musculaire subséquente est aggravée chez les mutants

(A) Expression de *Srf* et d'*Acta1* dans les TA contralatéraux et immobilisés par une agrafe, comme décrit (Caron et al., 2009), de souris adultes mâles contrôles $Srf^{flox/flox}$ 7 jours après le début de la période d'immobilisation (n=5 par groupe). Les données (moyenne \pm SEM) sont normalisées par l'expression d'*Hmbs* et sont présentées comme des fold-change relatifs aux muscles contralatéraux. *, p<0.05 **(B)** Ratio poids du TA immobilisé / poids du TA contralatéral chez des souris adultes mâles contrôles et mutantes ($Srf^{flox/flox}$ et HSA-Cre-ER^{T2}: $Srf^{flox/flox}$ respectivement), 7 jours après le début de la période d'immobilisation (n=6 par groupe). Les données sont les moyennes \pm SEM. *, p<0.05

Nos travaux ont permis de mettre en évidence une diminution de l'activité de Srf au cours de l'atrophie musculaire induite par dénervation, par ténotomie et par immobilisation. Le Tableau 4 regroupe les caractéristiques de ces types d'atrophie

en matière d'influx nerveux, de contraction et d'étirement. Dans l'article, la comparaison entre dénervation et ténotomie nous a permis de conclure que l'absence d'influx nerveux n'est pas responsable de la baisse d'activité de Srf. Les modèles de ténotomie et d'immobilisation permettent de maintenir l'influx nerveux et la contraction tout en empêchant l'étirement. Les résultats obtenus avec ces deux modèles suggèrent ainsi que la diminution de l'activité de Srf pourrait être due à l'absence d'étirement.

Tableau 4 : caractéristiques des types d'atrophie musculaire induits par un arrêt de l'activité mécanique

	Dénervation	Ténotomie	Immobilisation
Influx nerveux	non	oui	oui
Contraction	non	oui	oui
Etirement	non	non	non

- b. La résistance à l'atrophie due au maintien de l'activité de Srf n'implique pas de contribution des cellules satellites

Nous avons montré dans l'article que l'injection d'AAV-SRFVP16 dans le TA de souris contrôles dénervées confère aux muscles injectés une résistance à l'atrophie musculaire induite par dénervation reposant sur le maintien de l'activité de Srf (Figure 2F à I de l'article). Dans le but de vérifier que la forme constitutivement active de Srf, SRFVP16, n'induit pas le processus de myogenèse adulte, nous avons quantifié le nombre de myoblastes entrés en prolifération grâce à un immunomarquage de Pax7 et de Ki67 réalisé sur des muscles injectés ou non avec les AAV-SRFVP16, dénervés ou non (Figure 28). Le résultat obtenu indique que SRFVP16 n'augmente pas le nombre de cellules satellites en prolifération, excluant l'hypothèse selon laquelle la résistance à l'atrophie musculaire acquise grâce à l'injection d'AAV-SRFVP16 serait due à une contribution des cellules satellites.

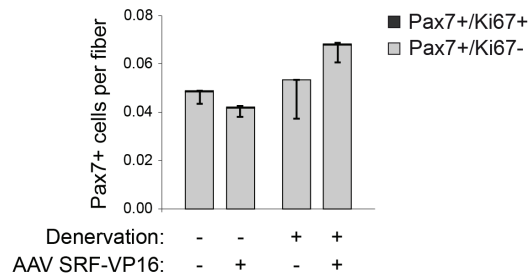


Figure 28 : les cellules satellites ne contribuent pas à la résistance à l’atrophie acquise par l’injection d’AAV-SRFVP16

Proportion de noyaux Pax7+/Ki67+ et Pax7+/Ki67- par fibre dans les TA de souris adultes mâles contrôles $Srf^{flox/flox}$, injectées ou non avec des AAV-SRFVP16, après 7 jours de dénervation (n=2 par groupe). Les données sont les moyennes \pm SEM.

Notons que le nombre de cellules satellites présente une tendance à l’augmentation avec la dénervation, précédemment décrite (Dedkov et al., 2003; van der Meer et al., 2011).

- c. L’inhibition de Mrtf-A/Srf par l’administration de CCG-1423 reproduit le phénotype du KO de Srf

Dans l’article, nous proposons le modèle selon lequel l’atrophie musculaire serait en partie due à une diminution de l’activité transcriptionnelle de Srf par la délocalisation de Mrtf-A. Afin de confirmer cette hypothèse, nous avons choisi d’inhiber Mrtf-A/Srf et d’analyser les conséquences de cette inhibition sur l’atrophie. Le composé chimique CCG-1423 a été décrit comme bloquant la transcription dépendante de Mrtf-A par une inhibition de la formation du complexe Mrtf-A/Srf (Evelyn et al., 2007). En outre, il a été montré sur des cultures de fibroblastes que le composé CCG-1423 perturbe l’accumulation nucléaire de Mrtf-A suite à une stimulation par le sérum (Minami et al., 2012). Ce composé a été utilisé pour observer les effets de la perturbation du complexe Mrtf-A/Srf dans de nombreux travaux (Evelyn et al., 2007; Sandbo et al., 2011; Zhou et al., 2013).

Des souris contrôles ont été injectées en intra-péritonéal avec 0,15 mg/kg de CCG-1423 dilué dans une solution à 1,5% diméthylsulfoxyde (DMSO) dans du sérum physiologique, ou avec cette solution seule, la veille de la dénervation, puis chaque jour pendant 7 jours après l’opération de dénervation. L’efficacité de l’inhibition de l’activité de Srf par le composé CCG-1423 reste à valider ; pour cela, nous allons notamment analyser l’expression de certaines cibles de Srf. Néanmoins, après 7 jours de dénervation, les muscles dénervés des souris qui ont reçu le composé CCG-1423 présentent une atrophie musculaire aggravée, ce qui reproduit le

phénotype des muscles dénervés des souris mutantes (Figure 29A et Figure 2B de l'article). En outre, l'inhibition de Mrtf-A/Srf au cours de l'atrophie musculaire induite par restriction calorique n'a aucune incidence sur le taux d'atrophie musculaire (Figure 29B).

Ces résultats permettent de conclure que l'inhibition de l'activité Mrtf-A/Srf, que celle-ci soit due au KO de Srf ou à l'administration de CCG-1423, entraîne une aggravation de l'atrophie musculaire. Ces résultats appuient le modèle que nous proposons, dans lequel la diminution de l'activité transcriptionnelle de Srf participe à l'atrophie musculaire.

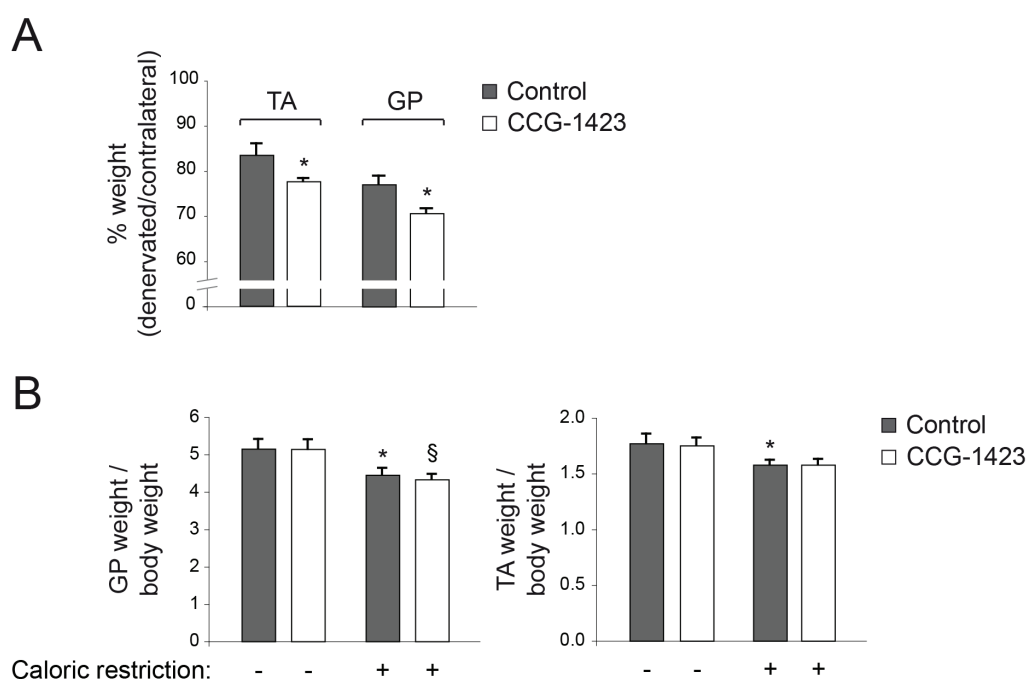


Figure 29 : l'inhibition de Mrtf-A/Srf par l'administration de CCG-1423 reproduit le phénotype du KO de Srf

(A) Ratio poids du muscle dénervé / poids du muscle contralatéral pour les TA et les GP de souris adultes mâles $Srf^{flox/flox}$, contrôles ou injectées avec le composé CCG-1423, 7 jours après dénervation (n=5 par groupe). Les données sont les moyennes \pm SEM. *, $p < 0.05$ **(B)** Ratio poids du muscle / poids total pour les GP et TA de souris $Srf^{flox/flox}$ contrôles ou injectées avec le composé CCG-1423, après 7 jours de restriction calorique à 50% (n=4 minimum par groupe). Les données sont les moyennes \pm SEM. *, $p < 0.05$ versus souris contrôles non restreintes (-); §, $p < 0.05$ versus souris CCG-1423 non restreintes (-)

d. L'accumulation d'actine monomérique nucléaire est due à la dénervation et non à la modulation de l'activité de Srf

Suite à la dénervation, des particules d'actine monomérique s'accumulent dans le noyau des fibres musculaires (Figure 4D de l'article). Nous avons pris le parti d'imputer cette accumulation d'actine G à la suppression de l'activité mécanique.

Néanmoins, Srf régulant l'expression de gènes impliqués dans la régulation de la dynamique de l'actine, on peut émettre l'hypothèse selon laquelle l'accumulation d'actine serait due à la diminution de l'activité de Srf au cours de la dénervation.

Dans le but de tester cette hypothèse, j'ai réalisé un marquage DNase I de l'actine G sur des coupes de muscles dans lesquels l'activité de Srf est modulée. Lorsque l'activité de Srf est inhibée, dans le cas du modèle de KO de Srf ou de l'administration du composé CCG-1423, aucune accumulation d'actine G n'est visible dans les noyaux des fibres (Figure 30, lignes C et E). L'expression de la forme constitutivement active de Srf, SRFVP16, ne provoque pas non plus de variation d'actine G nucléaire (Figure 30, ligne G). En revanche, dans tous les cas, une accumulation d'actine G dans les noyaux des fibres est visible après 7 jours de dénervation (Figure 30, lignes B, D, F et H).

Ces résultats indiquent que l'accumulation d'actine G dans les noyaux des fibres après dénervation est provoquée par la dénervation elle-même et non par la modulation de l'activité de Srf.

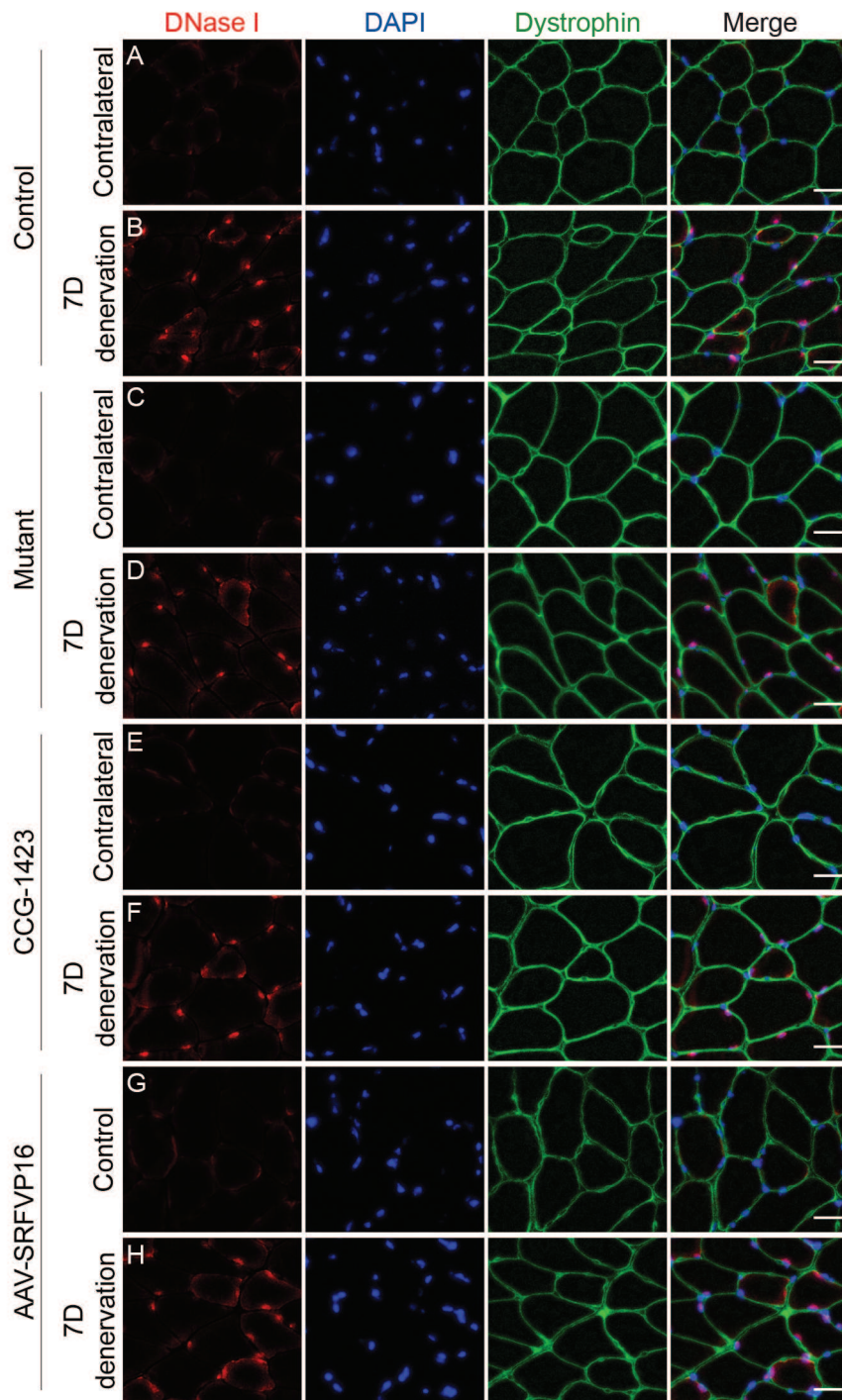


Figure 30 : l'accumulation d'actine G nucléaire est due au manque d'activité mécanique et non à la modulation de l'activité de Srf

Immunomarquage de l'actine G à la DNase I / Texas Red (Molecular Probes) et de la dystrophine (Leica) réalisé sur des TA contralatéraux ou dénervés de souris adultes mâles $Srf^{flox/flox}$ (A et B), $HSA-Cre-ER^{T2};Srf^{flox/flox}$ (C et D), $Srf^{flox/flox}$ injectées en intra-péritonéal avec le composé CCG-1423 (E et F) ou dont le TA a été injecté avec des AAV-SRFVP16 (G et H), 7 jours après dénervation. (Barre d'échelle, 50 μ m)

e. La fusion mitochondriale pourrait être altérée dans les muscles dénervés dépourvus de Srf

De nombreux travaux décrivent des variations dans le nombre, la forme et la fonction des mitochondries du muscle squelettique lorsque celui-ci est soumis à une période d'inactivité prolongée ; ces variations se traduisent notamment par une diminution de la synthèse de protéines mitochondriales, une dysfonction de la respiration mitochondriale et une production accrue de dérivés réactifs de l'oxygène (ROS) participant à l'atrophie musculaire (Abadi et al., 2009; Adihetty et al., 2007; Kavazis et al., 2009; Muller et al., 2007; Powers et al., 2012). Au contraire, plusieurs études montrent que la restriction calorique favorise la biogenèse et la fonction mitochondriales, ce qui a notamment pour effet d'augmenter la production d'ATP tout en diminuant la quantité de ROS produites (Civitarese et al., 2007; López-Lluch et al., 2006; Nisoli et al., 2005). L'altération de la fonction mitochondriale est donc spécifique du stimulus induisant l'atrophie musculaire.

Par ailleurs, il a été montré que la dénervation entraîne une augmentation du processus de fission mitochondriale (Iqbal et al., 2013), que ce processus contribue directement à l'atrophie musculaire (Romanello et al., 2010) et que Srf pourrait l'influencer puisque son invalidation dans des hippocampes de souris est associée à une augmentation de l'expression du gène codant pour la protéine de fission mitochondriale Fis1 (Beck et al., 2012). Un lien étant ainsi établi entre Srf et fission mitochondriale, nous avons émis l'hypothèse selon laquelle l'aggravation de l'atrophie musculaire observée lorsque l'activité transcriptionnelle de Srf est réduite pourrait être liée à une fragmentation accrue des mitochondries et/ou à une variation de la fonction mitochondriale.

Afin de tester cette hypothèse, j'ai tout d'abord quantifié les transcrits des gènes *March5* et *Park2*, codant pour des E3 ubiquitines ligases mitochondriales, dans des muscles contrôles et mutants après dénervation (Figure 31A). La quantité de transcrits de ces gènes augmente de la même manière chez les contrôles et les mutants après 7 jours de dénervation. Les transcrits de *Bnip3*, qui est décrit comme déclenchant une dysfonction mitochondriale (Gustafsson, 2011; Kubli et al., 2007), semblent augmenter de façon plus importante chez les mutants, toutefois cette différence n'est pas significative. Ces résultats suggèrent que les mitochondries ne sont pas dégradées de façon plus importante dans les muscles dépourvus de Srf suite à la dénervation. Par ailleurs, la quantification de l'ADN mitochondrial dans des muscles contrôles et des muscles où l'activité transcriptionnelle de Srf est réduite *via* l'injection de CCG-1423 montre que la quantité d'ADN mitochondrial n'est pas

diminuée dans les muscles CCG-1423 dénervés par rapport aux muscles contrôles dénervés (Figure 31B).

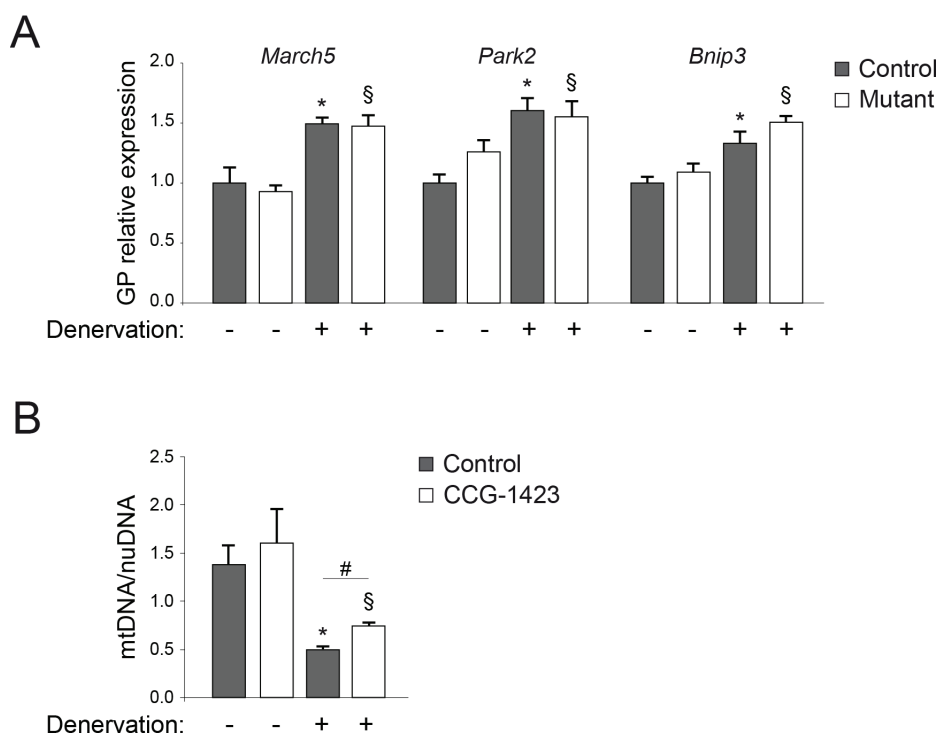


Figure 31 : l'absence de Srf n'induit pas de dégradation mitochondriale plus importante après dénervation

(A) Expression de *March5*, *Park2* et *Bnip3* dans les GP contralatéraux et dénervés de souris adultes mâles contrôles $Srf^{flox/flox}$ ou mutantes $HSA-Cre-ER^{T2};Srf^{flox/flox}$, 7 jours après dénervation (n=4 minimum par groupe). Les données (moyenne \pm SEM) sont normalisées par l'expression d'*Hmbs* et sont présentées comme des fold-change relatifs aux muscles contralatéraux. *, p<0.05 versus GP contrôle contralatéral (-) ; §, p<0.05 versus GP mutant contralatéral (-) **(B)** Ratio ADN mitochondrial / ADN génomique dans les GP contralatéraux et dénervés de souris adultes mâles $Srf^{flox/flox}$ contrôles ou injectées avec le composé CCG-1423, 7 jours après dénervation (n=5 par groupe). Les données sont les moyennes \pm SEM. *, p<0.05 versus GP contrôle contralatéral (-) ; §, p<0.05 versus GP CCG-1423 contralatéral ; # versus GP contrôle dénervé (+)

J'ai ensuite évalué la balance entre fission et fusion mitochondriales en quantifiant certaines protéines impliquées dans ces phénomènes (Figure 32).

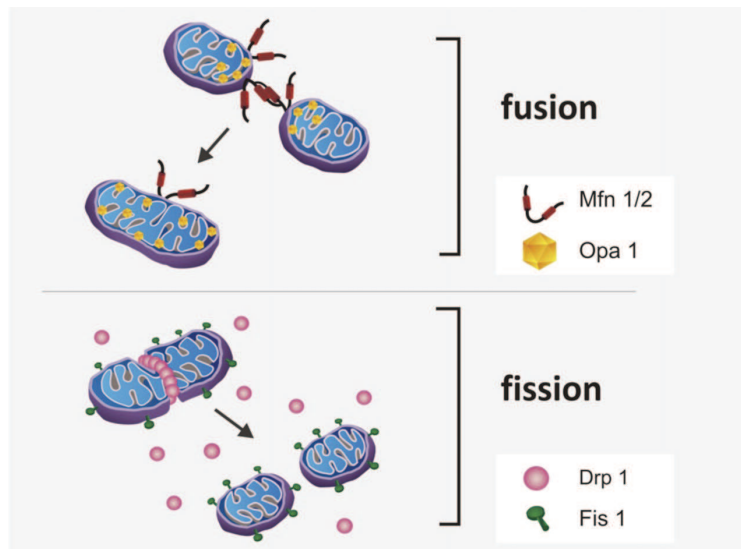


Figure 32 : protéines impliquées dans les processus de fusion et de fission mitochondriales

(d'après Powers et al., 2012)

J'ai analysé la quantité de protéines Drp1, impliquées dans la fission mitochondriale, et des protéines MFN2 et OPA1, acteurs majeurs de la fusion mitochondriale, après 7 jours de dénervation (Figure 33). Contrairement à Drp1, dont la quantité ne semble pas varier entre les contrôles et les mutants dénervés, la quantité de protéines OPA1 et MFN2 chez les mutants dénervés est significativement inférieure à celle des contrôles dénervés. En particulier, la quantité d'OPA1, qui augmente d'environ 70% avec la dénervation dans les muscles contrôles, diminue de plus de 60% chez les mutants.

La diminution de l'activité de Srf n'affecte donc pas les mitochondries à l'état basal. Cependant, suite à l'arrêt de l'activité mécanique provoqué par la dénervation, les muscles dénervés invalidés pour Srf présentent une forte diminution de la quantité d'OPA1 et de MFN2, suggérant que le processus de fusion mitochondriale est altéré dans ces muscles. Afin de le confirmer, nous allons examiner le réseau mitochondrial dans des muscles contralatéraux et dénervés de souris contrôles et mutantes en microscopie électronique. Nous souhaitons également répéter ces expériences sur des muscles de souris contrôles et mutantes soumises à une période de restriction calorique, afin de vérifier que les variations d'OPA1 et de MFN2 associées à la délétion de Srf sont spécifiques de l'atrophie musculaire induite par arrêt de l'activité mécanique.

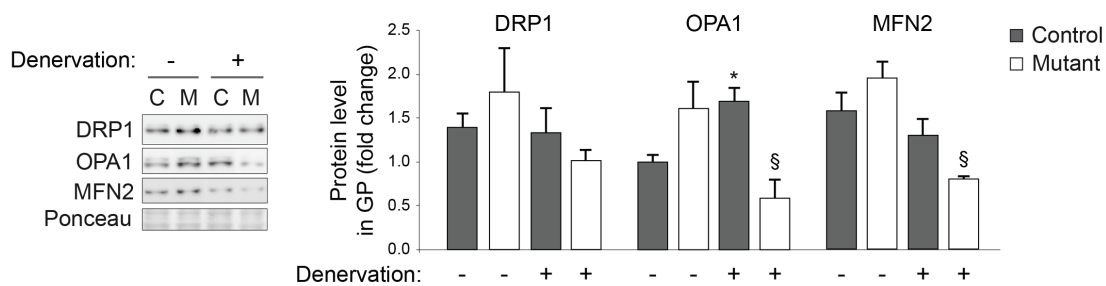


Figure 33 : la fusion mitochondriale pourrait être altérée dans les muscles dénervés dépourvus de Srf

Western blot représentatif pour DRP1 (BD Biosciences), OPA1 (BD Biosciences), MFN2 (Santa Cruz) et quantification de ces protéines dans les GP de muscles contralatéraux et dénervés de souris contrôles $Srf^{flox/flox}$ et mutantes $HSA-Cre-ER^{T2};Srf^{flox/flox}$, 7 jours après dénervation (n=3 par groupe). Les données de quantification (moyenne \pm SEM) sont normalisées par le Ponceau et sont présentées comme des fold-change relatifs aux muscles contrôles contralatéraux. *, p<0.05 *versus* GP contrôle contralatéral (-) ; §, p<0.05 *versus* GP mutant contralatéral (-)

f. Analyse des transcriptomes de muscles contrôles et mutants en situation d'atrophie musculaire

Afin de comprendre comment et par quelle(s) voie(s) la perte de Srf aggrave spécifiquement l'atrophie musculaire induite par perte d'activité, nous avons réalisé une étude des transcriptomes de muscles contrôles et mutants suite à 7 jours de dénervation ou de restriction calorique par des puces Affymetrix.

D'une part, l'analyse des données grâce au logiciel Ingenuity nous indique que Srf est un « upstream regulator » dans les situations suivantes :

- comparaison muscle mutant contralatéral *versus* muscle contrôle contralatéral,
- comparaison muscle contrôle dénervé *versus* muscle contrôle contralatéral,
- comparaison muscle mutant dénervé *versus* muscle contrôle dénervé.

Au contraire, Srf ne l'est pas dans les cas suivants :

- comparaison muscle contrôle restreint *versus* muscle contrôle non restreint,
- comparaison muscle mutant restreint *versus* muscle contrôle restreint.

Cela confirme que Srf est spécifiquement impliqué dans l'atrophie par dénervation et qu'il ne joue pas de rôle au cours de la restriction calorique.

D'autre part, nous avons mis en évidence que 1495 gènes sont exprimés de façon significativement différente (p<0,05) entre des muscles contrôles et mutants dénervés. Dans le cas de la restriction calorique, l'expression de 1709 gènes est

significativement différente entre des muscles issus de souris contrôles et mutantes soumises à une période de restriction calorique. La représentation de ces données par un diagramme de Venn indique que ces deux ensembles ont 317 gènes en commun (Figure 34). Dans le but de comprendre quelle(s) voie(s) est (sont) responsable(s) de l'aggravation de l'atrophie observée chez les mutants, nous nous intéresserons à la partie violette du graphique, c'est-à-dire aux gènes dont l'expression varie spécifiquement avec la dénervation.

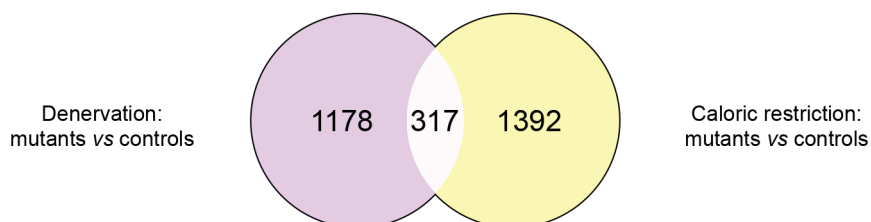


Figure 34 : diagramme de Venn des ensembles de gènes variant entre mutants et contrôles lors de la dénervation et de la restriction calorique

(d'après Oliveros, J. C. (2007) VENNY. <http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>)

Diagramme de Venn représentant les ensembles de gènes dont l'expression varie significativement ($p < 0.05$) entre les GP issus de souris contrôles $Srf^{flox/flox}$ et mutantes $HSA-Cre-ER^{T2} : Srf^{flox/flox}$, après 7 jours de dénervation ou de restriction calorique (puces Affymetrix). Ces listes ont été obtenues grâce au logiciel Ingenuity et à la Plateforme Génomique et Transcriptomique de l'Institut Cochin.

L'autophagie est un mécanisme catabolique impliqué dans la dégradation des protéines et des organelles en conditions normales et en réponse à divers stimuli, dont l'arrêt de l'activité musculaire (Bonaldo and Sandri, 2013). L'analyse des fonctions (Ingenuity) altérées dans les différentes situations nous indique que le processus autophagique pourrait être augmenté dans les muscles mutants dénervés par rapport aux muscles contrôles dénervés. En effet, parmi les fonctions touchées par la dénervation dans les muscles mutants et contrôles, plusieurs fonctions associées à l'autophagie sont significativement affectées ($p < 0,05$ soit $-\log(p\text{-value}) < 1,3$) (Figure 35). Les scores Z d'activation associés sont proches de 2 ou supérieurs à 2, ce qui signifie que les prédictions sont fiables. En revanche, dans le cas de la comparaison muscle mutant restreint *versus* muscle contrôle restreint et de la comparaison muscle mutant contralatéral *versus* muscle contrôle contralatéral, les fonctions liées à l'autophagie ne sont pas prédites comme affectées. Notons que l'absence d'effet direct de la délétion de *Srf* sur des fonctions liées à l'autophagie a été vérifiée *in vitro* : l'analyse du transcriptome de myoblastes en prolifération ou à 1 ou 3 jours de différenciation, contrôles ou invalidés pour *Srf*, ne révèle aucune différence entre contrôles et mutants (travaux de Voahangy Randrianarison, membre

de l'équipe). Les effets de Srf sur l'autophagie pourraient donc être spécifiques d'une situation catabolique *in vivo*.

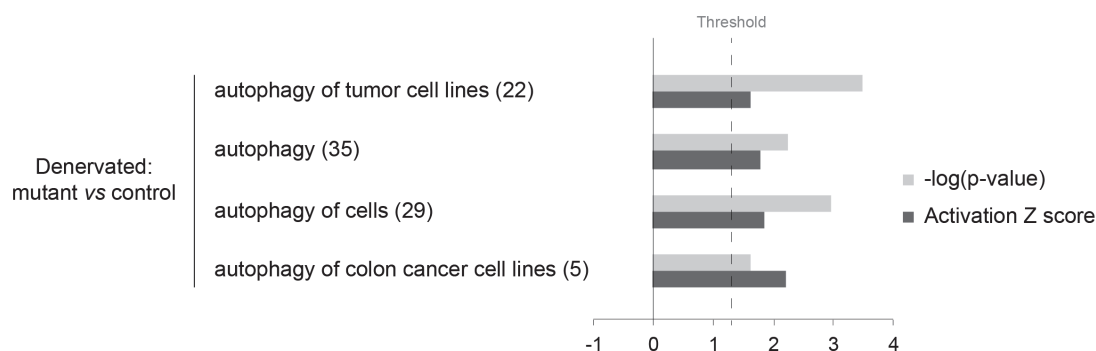


Figure 35 : fonctions associées à l'autophagie significativement altérées dans les muscles mutants dénervés par rapport aux contrôles dénervés

Graphique représentant la valeur $-\log(p\text{-value})$ et le score Z d'activation associés aux fonctions liées à l'autophagie variant de manière significative ($p\text{-value} < 0.05$ soit $-\log(p\text{-value}) < 1.3$) entre les GP de souris mutantes HSA-Cre-ER^{T2}:Srf^{flox/flox} et contrôles Srf^{flox/flox}, après 7 jours de dénervation. Les valeurs entre parenthèses représentent le nombre de gènes variant significativement pris en compte dans chaque fonction. Ces données ont été obtenues grâce au logiciel Ingenuity et à la Plateforme Génomique et Transcriptomique de l'Institut Cochin.

Les fonctions représentées sur la Figure 35 comprennent un certain nombre de gènes, dont l'expression varie significativement entre mutants et contrôles dénervés (Tableau 5). En outre, leur expression ne varie pas entre des muscles de souris mutantes ou contrôles soumises à une période de restriction calorique. Ainsi, ces gènes font partie de la partie violette du diagramme de Venn présenté en Figure 34. Nous les validerons en quantifiant leur expression par qRT-PCR.

Tableau 5 : gènes inclus dans les fonctions liées à l'autophagie et variant spécifiquement avec la dénervation chez les mutants

Gene	Full name
<i>Ager</i>	advanced glycosylation end product-specific receptor
<i>Atg7</i>	autophagy related 7
<i>Bad</i>	BCL2-associated agonist of cell death
<i>Birc2</i>	baculoviral IAP repeat-containing 2
<i>Camp</i>	cathelicidin antimicrobial peptide
<i>Capn1</i>	calpain 1
<i>Chrnd</i>	cholinergic receptor, nicotinic, delta polypeptide
<i>Chuk</i>	conserved helix-loop-helix ubiquitous kinase
<i>Fadd</i>	Fas (TNFRSF6)-associated via death domain
<i>Fundc1</i>	FUN14 domain containing 1
<i>Ikbkg</i>	inhibitor of kappaB kinase gamma
<i>Krt18</i>	keratin 18
<i>Map1lc3a</i>	microtubule-associated protein 1 light chain 3 alpha (LC3)
<i>Map2k1</i>	mitogen-activated protein kinase kinase 1
<i>Map2k2</i>	mitogen-activated protein kinase kinase 2
<i>Mapk14</i>	mitogen-activated protein kinase 14
<i>Mapt</i>	microtubule-associated protein tau
<i>Mdm2</i>	transformed mouse 3T3 cell double minute 2
<i>Megf10</i>	multiple EGF-like-domains 10
<i>Myc</i>	myelocytomatosis oncogene
<i>Myl3</i>	myosin, light polypeptide 3
<i>Nlr4</i>	NLR family, CARD domain containing 4
<i>Prkaa1</i>	protein kinase, AMP-activated, alpha 1 catalytic subunit
<i>Prkaa2</i>	protein kinase, AMP-activated, alpha 2 catalytic subunit
<i>Smyd3</i>	SET and MYND domain containing 3
<i>Tbc1d9b</i>	TBC1 domain family, member 9B
<i>Tlr5</i>	toll-like receptor 5
<i>Tsc2</i>	tuberous sclerosis 2
<i>Vti1b</i>	vesicle transport through interaction with t-SNAREs 1B

Gènes faisant partie des fonctions liées à l'autophagie et dont l'expression varie significativement ($p < 0.05$) entre les GP de souris mutantes HSA-Cre-ER^{T2} :Srf^{flox/flox} et contrôles Srf^{flox/flox}, après 7 jours de dénervation et ne varie pas entre les GP de souris mutantes HSA-Cre-ER^{T2} :Srf^{flox/flox} et contrôles Srf^{flox/flox}, après 7 jours de restriction calorique. Cette liste de gènes a été obtenue grâce au logiciel Ingenuity et à la Plateforme Génomique et Transcriptomique de l'Institut Cochin.

g. Augmentation du nombre d'autophagosomes en absence de Srf ?

L'analyse des données de transcriptome suggère que l'autophagie pourrait être augmentée dans les muscles mutants dénervés. Afin de tester cette hypothèse, nous avons entrepris de quantifier le nombre d'autophagosomes formés suite à la dénervation.

Au cours du processus d'autophagie, la protéine LC3 est conjuguée à la phosphatidyléthanolamine (PE) et ce complexe est incorporé à la membrane des pré-autophagosomes. La forme libre de LC3 est appelée LC3-I et la forme conjuguée à la PE est nommée LC3-II. Une augmentation du ratio LC3-II/LC3-I représente une

augmentation du nombre d'autophagosomes (Mizushima and Yoshimori, 2007). Dans les muscles contralatéraux, le ratio LC3-II/LC3-I augmente d'environ 93% chez les mutants (Figure 36). De plus, le ratio LC3-II/LC3-I double chez les contrôles et triple chez les mutants dénervés (+450% par rapport aux muscles contrôles contralatéraux). Cependant, il est important de noter que la protéine LC3-II est à la fois produite et dégradée au cours du phénomène d'autophagie (Ju et al., 2010). Le résultat que nous obtenons doit donc être confirmé par d'autres approches. Afin de valider l'augmentation du nombre d'autophagosomes chez les mutants dénervés, nous projetons d'analyser la quantité de protéines p62, protéines cargo associées aux autophagosomes, et d'observer des coupes de muscles contrôles et mutants dénervés en microscopie électronique. Nous pourrions également quantifier le nombre de protéines LC3-II réellement produites suite à la dénervation en injectant un inhibiteur de l'autophagie tel que la colchicine. Ce type de molécule permet en effet le blocage du flux autophagique en prévenant la maturation des autophagosomes (Ju et al., 2010). Par ailleurs, nous souhaitons évaluer l'autophagie dans les muscles de souris contrôles et mutantes soumises à une période de restriction calorique. Les résultats de l'analyse transcriptomique suggèrent que l'intensité du processus autophagique ne devrait pas différer entre contrôles et mutants dans cette situation.

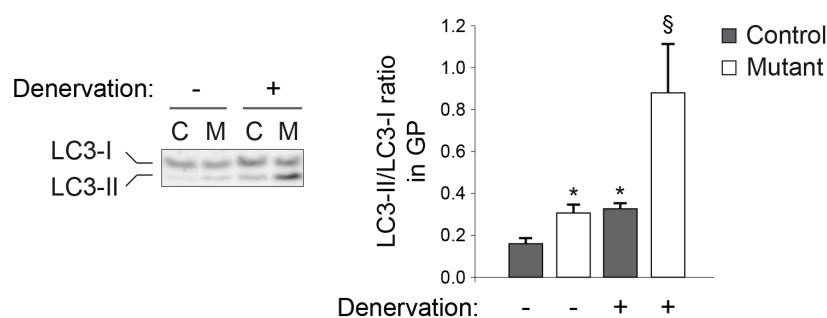


Figure 36 : augmentation du nombre d'autophagosomes en absence de Srf

Western blot représentatif pour LC3 (Sigma) et ratio des quantifications LC3-II/LC3-I dans les GP de muscles contralatéraux et dénervés de souris contrôles $Srf^{flox/flox}$ et mutantes $HSA-Cre-ER^{T2};Srf^{flox/flox}$, 7 jours après dénervation (n=3 par groupe). Les données sont les moyennes \pm SEM. *, $p < 0.05$ versus GP contrôle contralatéral (-) ; §, $p < 0.05$ versus GP mutant contralatéral (-)

4. Conclusion

Les résultats obtenus au cours de cette étude mettent en évidence le rôle fonctionnel que joue la voie actine/Mrtfs/Srf au cours de l'atrophie musculaire. De plus, la comparaison de modèles d'atrophie musculaire provoquée par différents stimuli

révèle que cette voie intervient spécifiquement lorsque l'atrophie est induite par un arrêt de l'activité mécanique. Le modèle que nous proposons est le suivant : suite à un arrêt de l'activité musculaire, des particules monomériques d'actine s'accumulent dans les noyaux des myofibres, entraînant une délocalisation des Mrtfs qui sont exclus des noyaux et s'accumulent dans un espace cytoplasmique péri-nucléaire, provoquant une diminution de l'activité transcriptionnelle de Srf (Figure 37). La baisse de la transcription Srf-dépendante, et notamment celle des gènes cibles de Srf codant pour des protéines sarcomériques, participerait à l'atrophie musculaire. Par ailleurs, certaines expériences détaillées dans les résultats complémentaires suggèrent qu'une baisse d'activité de Srf, en conditions atrophiques, pourrait donner lieu à une altération de la fonction mitochondriale et du processus autophagique par des mécanismes qui restent à éclaircir.

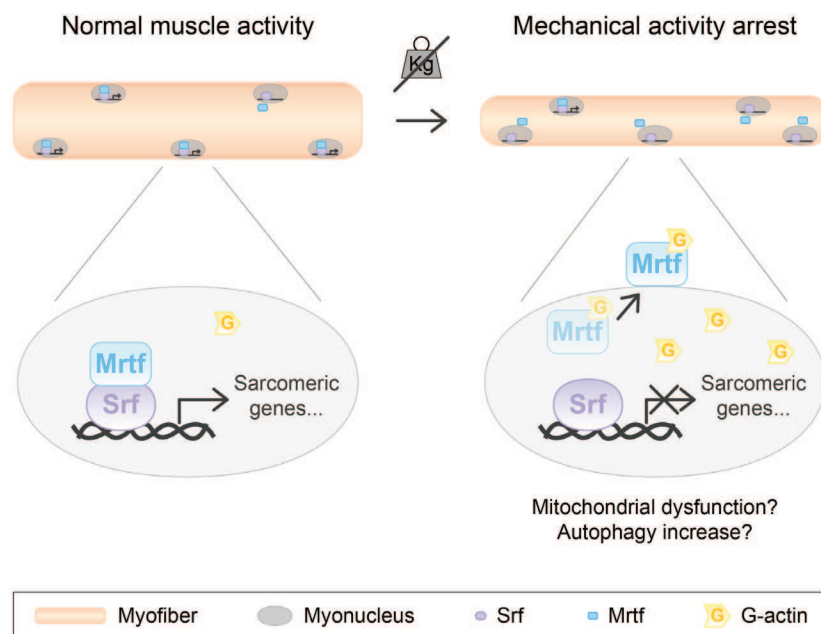


Figure 37 : la voie actine/Mrtfs/Srf contrôle l'atrophie musculaire due à un arrêt de l'activité mécanique

II. Deuxième partie : rôle de Srf dans les cellules satellites

Le muscle squelettique a la capacité de s'hypertrophier en réponse à une augmentation des signaux mécaniques. Ce phénomène fait notamment intervenir les cellules satellites, cellules souches du muscle adulte, qui s'activent, prolifèrent puis se différencient et fusionnent aux fibres musculaires préexistantes. L'équipe a précédemment démontré que la délétion fibre-spécifique de Srf donne lieu à un défaut de prolifération et de recrutement des cellules satellites aux fibres préexistantes, qui empêche les fibres de s'hypertrophier (Guerci et al., 2012). L'un des objectifs de ma thèse était d'aller plus loin dans la compréhension du rôle de Srf au cours du mécanisme d'hypertrophie compensatoire. Pour cela, j'ai étudié le rôle de Srf dans les cellules satellites au cours du processus de myogenèse adulte induit par les modèles d'hypertrophie compensatoire et de régénération musculaire.

1. Résultats préliminaires

a. Srf est exprimé dans les cellules satellites après leur activation

Afin de déterminer si Srf est exprimé dans les cellules satellites quiescentes, j'ai isolé des fibres musculaires à partir d'*Extensor Digitorum Longus* (EDL) de souris contrôles et les ai soit fixées directement après isolation, soit maintenues en culture flottante pendant 24h. L'isolation et la mise en culture sont en effet suffisantes à l'activation de la myogenèse adulte. Un immunomarquage de Pax7 et de Srf a permis de montrer que Srf est très peu exprimé dans les cellules satellites à l'état quiescent (Figure 38A et B). En revanche, après 24h de culture, Srf est exprimé dans la totalité des cellules satellites observées.

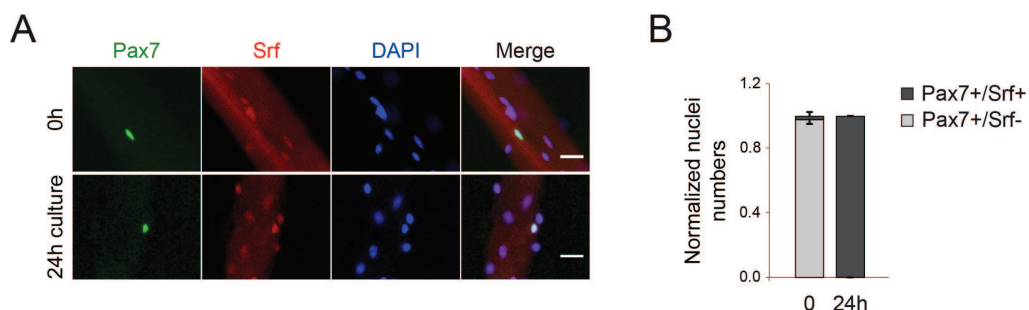


Figure 38 : Srf est très faiblement exprimé dans les cellules satellites quiescentes

(A) Immunomarquage de Pax7 (Santa Cruz) et de Srf (Santa Cruz) réalisé sur des fibres isolées à partir d'EDL de souris adultes mâles contrôles Srf^{fllox/fllox} fixées immédiatement ou après 24h de culture en

conditions flottantes (DMEM + 2% horse serum). (Barre d'échelle, 25 μ m) **(B)** Proportion de noyaux Pax7+/Srf+ et Pax7+/Srf- dans les fibres isolées à partir d'EDL fixées immédiatement ou après 24h de culture en conditions flottantes (50 noyaux minimum ont été analysés, de n=3 souris). Les données sont les moyennes \pm SEM.

b. La délétion de *Srf* dans les cellules satellites entraîne une altération de la régénération musculaire

Pour étudier le rôle de *Srf* dans les cellules satellites, nous avons tiré parti d'un modèle de délétion conditionnelle et inducible de *Srf* dans les cellules satellites, le modèle Pax7-Cre-ER^{T2} : *Srf*^{flox/flox} (collaboration avec l'équipe de S. Tajbakhsh à l'Institut Pasteur) (Sambasivan et al., 2009). Toutes les expériences sont réalisées sur des souris âgées de 2 à 3 mois, recevant 1 mg de tamoxifène par jour pendant 4 jours par injection intra-péritonéale. Afin de déterminer l'efficacité de la délétion de *Srf*, j'ai tout d'abord extrait l'ADN de cellules satellites quiescentes triées, provenant de souris contrôles et mutantes exprimant le transgène Tg Pax7-GFP (cellules triées au FACS grâce à la détection du signal GFP ; tri réalisé par V. Randrianarison). Ensuite, j'ai réalisé une qPCR sur l'ADN extrait, en utilisant un couple d'amorces dont l'une des deux est située dans la région floxée de *Srf* (exon 2) : l'amplification n'est possible que si cette région est présente. Le résultat indique que le KO est efficace à environ 98% (Figure 39A). Nous le confirmerons en comptant le nombre de cellules Pax7+/Srf+ sur fibres isolées de muscles de souris contrôles et mutantes, après 24h de culture. Nous pourrions également quantifier le nombre de transcrits de *Srf* par qRT-PCR, réalisée sur de l'ARN extrait de myoblastes en prolifération provenant de cellules satellites triées au FACS à partir de muscles de souris contrôles et mutantes.

Comme attendu, *Srf* n'étant pas exprimé dans les cellules satellites quiescentes (Figure 38A et B), sa délétion ne cause pas de variation du nombre de cellules satellites par fibre du *Plantaris* deux semaines après injection de tamoxifène (Figure 39B). Le TA donne des résultats comparables (non montré).

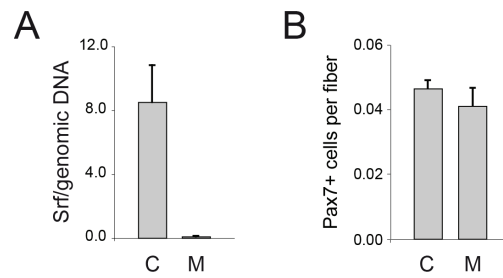


Figure 39 : modèle Pax7-Cre-ER^{T2} : Srf^{flox/flox}

(A) Ratio ADN Srf floxé / ADN génomique dans les cellules satellites de souris adultes contrôles Srf^{flox/flox} (C) et mutantes Pax7-Cre-ER^{T2} : Srf^{flox/flox} (M) triées au FACS par V. Randrianarison (100 000 cellules minimum ont été triées en regroupant 3 souris par génotype, n=2 expériences indépendantes). Les données sont les moyennes ± SEM. **(B)** Nombre de cellules Pax7+ par fibre dans les *Plantaris* de souris adultes mâles et femelles contrôles Srf^{flox/flox} (C) et mutantes Pax7-Cre-ER^{T2} : Srf^{flox/flox} (M), deux semaines après injection de tamoxifène (n=4 minimum par groupe). Le comptage des cellules satellites et des fibres a été réalisé grâce à un immunomarquage de Pax7 et de la dystrophine sur des coupes de *Plantaris*. Les données sont les moyennes ± SEM.

Nous avons soumis des souris contrôles et mutantes à un protocole de régénération par injection de cardiotoxine et avons sacrifié les souris 14 jours après injection. Un immunomarquage de la laminine a permis de mettre en évidence que le phénomène de régénération musculaire est altéré suite à la délétion de Srf dans les cellules satellites (Figure 40).

Toutefois, il est important de noter que, chez les souris mutantes, les fibres générées à partir de cellules satellites déficientes en Srf sont également invalidées pour Srf. Les travaux de l'équipe ayant démontré que l'expression de Srf dans les fibres est nécessaire à l'hypertrophie compensatoire par un contrôle paracrine de la prolifération et de la fusion des cellules satellites (Guerci et al., 2012), on ne peut négliger l'absence de Srf dans les fibres néoformées. En effet, celle-ci participe certainement à la gravité du phénotype observé chez les souris mutantes. Par conséquent, nous n'utiliserons le modèle de régénération musculaire qu'à des temps précoces, afin de se placer à des moments où les fibres commencent à peine à se former et où leur influence sur les cellules satellites est négligeable.

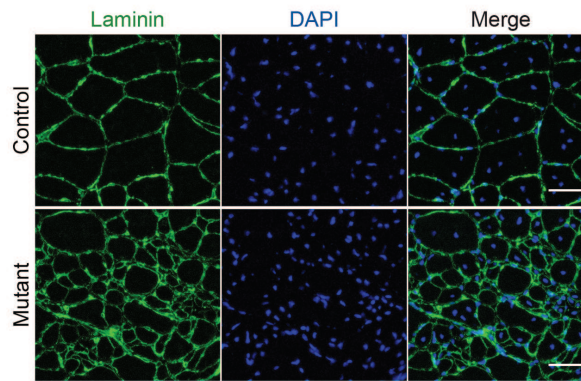


Figure 40 : la délétion de Srf dans les cellules satellites altère la régénération musculaire

Immunomarquage de la laminine (Sigma) réalisé sur des TA de souris adultes mâles contrôles $Srf^{flox/flox}$ et mutantes $Pax7-Cre-ER^{T2} : Srf^{flox/flox}$, 14 jours après injection de cardiotoxine (50 μ L, solution à 12 μ M). (Barre d'échelle, 50 μ m)

- c. L'expression de Srf dans les cellules satellites est nécessaire à l'hypertrophie compensatoire

Afin de continuer à explorer le rôle de Srf dans les cellules satellites tout en s'affranchissant du problème d'environnement lié à la régénération (fibres néoformées déficientes en Srf), nous avons choisi d'explorer les conséquences de la perte de Srf dans les cellules satellites au cours du phénomène d'hypertrophie musculaire. Pour ce faire, nous avons soumis des souris contrôles et mutantes à un protocole d'hypertrophie compensatoire par surcharge du *Plantaris*. Contrairement aux muscles des contrôles, les muscles des mutants sont incapables de s'hypertrophier, comme indiqué par la mesure du diamètre des fibres 21 jours après le début de la période d'hypertrophie compensatoire (Figure 41).

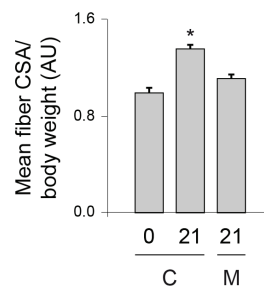


Figure 41 : l'absence de Srf dans les cellules satellites entraîne un défaut d'hypertrophie musculaire

Ratio CSA moyenne (\pm SEM) des fibres du *Plantaris* / poids du *Plantaris* de souris adultes mâles et femelles contrôles $Srf^{flox/flox}$ (C) et mutantes $Pax7-Cre-ER^{T2} : Srf^{flox/flox}$ (M), avant et après 21 jours d'hypertrophie compensatoire (400 fibres minimum ont été analysées de n=6 souris minimum par groupe). *, $p < 0.05$ versus *Plantaris* contrôle avant hypertrophie compensatoire (0)

L'importance de la contribution des cellules satellites à l'hypertrophie compensatoire est sujette à controverse (O'Connor and Pavlath, 2007; O'Connor et al., 2007). En effet, certaines études montrent qu'elles sont requises pour ce phénomène et d'autres qu'elles n'y sont pas indispensables (McCarthy et al., 2011; Rosenblatt and Parry, 1992; Rosenblatt et al., 1994). Nous montrons que l'inactivation de Srf dans les cellules satellites est suffisante à occasionner un défaut de croissance des fibres après 21 jours d'hypertrophie compensatoire. Nos résultats soutiennent donc les travaux concluant que l'intervention des cellules satellites est nécessaire à l'hypertrophie induite par surcharge.

d. Srf n'est pas requis pour la prolifération des myoblastes

Dans l'objectif d'expliquer l'absence d'hypertrophie musculaire et le défaut de régénération des muscles dont les cellules satellites sont dépourvues de Srf, et en se basant sur une étude réalisée au laboratoire montrant que Srf est requis pour la prolifération de cellules myogéniques C2C12 (Soulez et al., 1996), nous avons tout d'abord émis l'hypothèse selon laquelle la délétion de Srf pourrait provoquer un défaut de prolifération des myoblastes. D'une part, nous avons testé cette hypothèse dans le contexte de l'hypertrophie compensatoire. Après 7 jours d'hypertrophie compensatoire, la quantification du nombre de myoblastes en prolifération, exprimant à la fois Pax7 et le marqueur de prolifération Ki67, nous indique que les myoblastes dépourvus de Srf prolifèrent de manière aussi efficace que les myoblastes contrôles (Figure 42A et B).

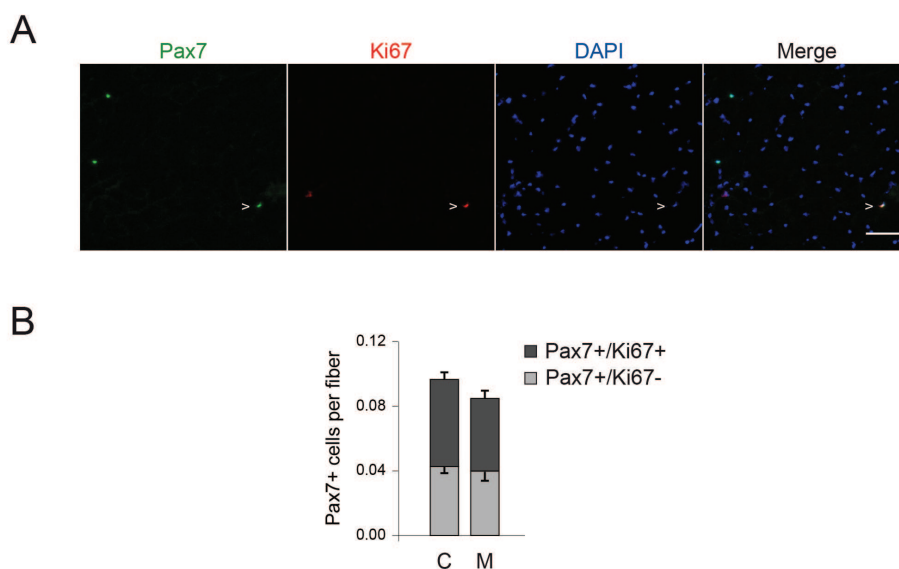


Figure 42 : nombre de cellules Pax7+/Ki67+ après 7 jours d'hypertrophie compensatoire

(A) Immunomarquage de Pax7 (Santa Cruz) et de Ki67 (Abcam) illustrant des cellules satellites quiescentes (Pax7+/Ki67-) et des cellules satellites entrées dans le cycle cellulaire (Pax7+/Ki67+, flèche) réalisé sur un *Plantaris* de souris contrôle $Srf^{flox/flox}$, après 7 jours d'hypertrophie compensatoire. (Barre d'échelle, 50 μ m) **(B)** Proportion de noyaux Pax7+/Ki67+ et Pax7+/Ki67- par fibre dans les *Plantaris* de souris adultes mâles et femelles contrôles $Srf^{flox/flox}$ (C) et mutantes Pax7-Cre-ER^{T2} : $Srf^{flox/flox}$ (M), après 7 jours d'hypertrophie compensatoire (n=8 par groupe). Les données sont les moyennes \pm SEM.

D'autre part, nous avons comparé la prolifération des myoblastes mutants et contrôles au cours des étapes précoces de la régénération musculaire. En effet, durant les temps précoces suivant l'injection de cardiotoxine, les fibres sont encore très immatures et le problème de l'environnement lié à la régénération (fibres néoformées déficientes en Srf) ne se pose pas. Une quantification de la prolifération cellulaire globale 2 jours après injection de cardiotoxine, réalisée grâce à l'immunomarquage du BrdU qui avait été injecté en intra-péritonéal aux souris la veille de leur sacrifice, ne révèle pas de différence significative entre les muscles contrôles et mutants (Figure 43A et B). De plus, le comptage des cellules exprimant à la fois Pax7 et Ki67 4 jours après cardiotoxine confirme le résultat obtenu dans le contexte de l'hypertrophie : qu'ils soient invalidés pour Srf ou non, les myoblastes prolifèrent autant (Figure 43C et D). L'ensemble de ces résultats indique que l'expression de Srf par les myoblastes n'est pas nécessaire à leur prolifération. Notons que, la prolifération n'étant pas altérée, nous pouvons supposer que l'étape d'activation des cellules satellites, qui précède l'étape de prolifération, se déroule également de manière normale chez les mutants.

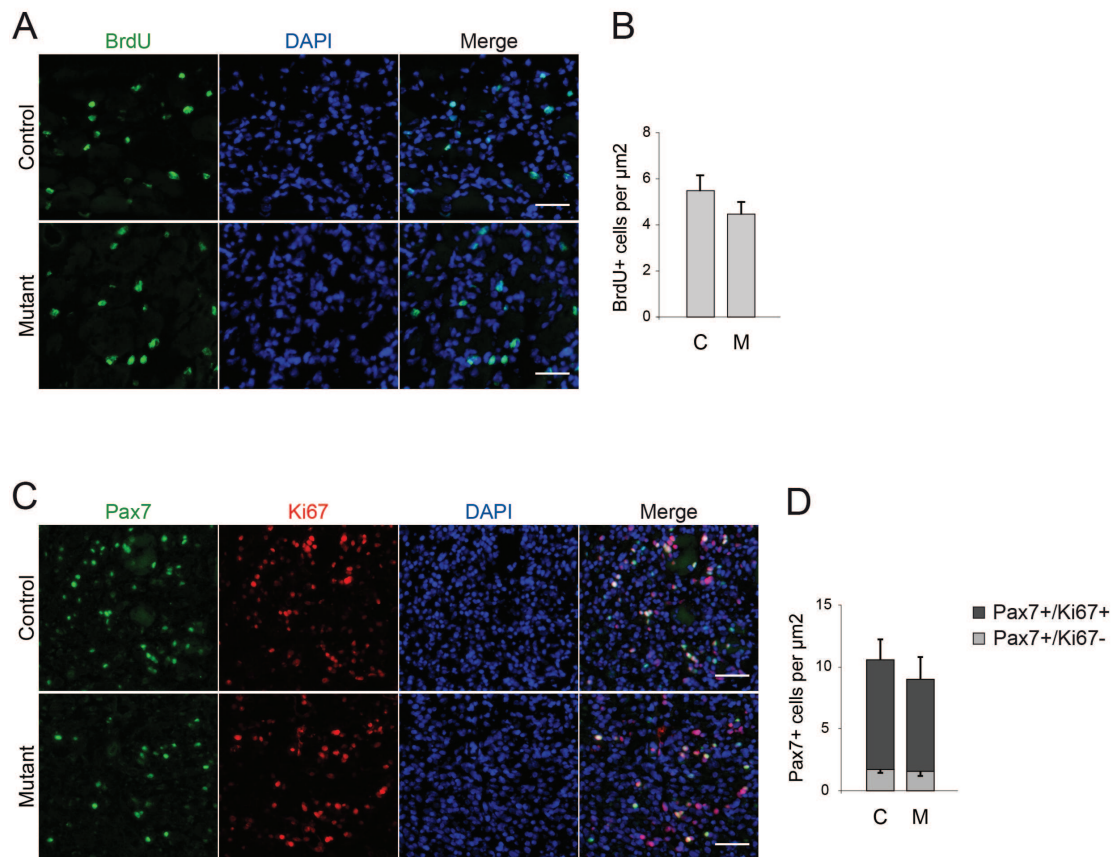


Figure 43 : l'absence d'expression de Srf dans les myoblastes ne modifie pas leur taux de prolifération

(A) Immunomarquage du BrdU (Dako) réalisé sur des TA de souris adultes mâles contrôles $\text{Srf}^{\text{flox/flox}}$ et mutantes $\text{Pax7-Cre-ER}^{\text{T2}} : \text{Srf}^{\text{flox/flox}}$, 2 jours après injection de cardiotoxine. Les souris ont reçu du BrdU en intra-péritonéal la veille du sacrifice. (Barre d'échelle, 50 μm) (B) Nombre de noyaux BrdU+ par μm^2 dans les TA de souris adultes mâles contrôles $\text{Srf}^{\text{flox/flox}}$ (C) et mutantes $\text{Pax7-Cre-ER}^{\text{T2}} : \text{Srf}^{\text{flox/flox}}$ (M), 2 jours après injection de cardiotoxine (n=3 minimum par groupe). Les données sont les moyennes \pm SEM. (C) Immunomarquage de Pax7 (Santa Cruz) et de Ki67 (Abcam) réalisé sur des TA de souris adultes mâles contrôles $\text{Srf}^{\text{flox/flox}}$ et mutantes $\text{Pax7-Cre-ER}^{\text{T2}} : \text{Srf}^{\text{flox/flox}}$, 4 jours après injection de cardiotoxine. (Barre d'échelle, 50 μm) (D) Proportion de noyaux Pax7+/Ki67+ et Pax7+/Ki67- par μm^2 dans les TA de souris adultes mâles et femelles contrôles $\text{Srf}^{\text{flox/flox}}$ (C) et mutantes $\text{Pax7-Cre-ER}^{\text{T2}} : \text{Srf}^{\text{flox/flox}}$ (M), 4 jours après injection de cardiotoxine (n=7 par groupe). Les données sont les moyennes \pm SEM.

e. Altération de la différenciation tardive en absence de Srf ?

Le facteur de régulation myogénique MyoD contrôle l'entrée en différenciation des myoblastes, à la fois parce qu'il régule la sortie du cycle cellulaire (Crescenzi et al., 1990; Halevy et al., 1995) et parce qu'il contrôle l'expression de Myogénine (Bergstrom et al., 2002; Zanou and Gailly, 2013). L'expression du gène *MyoD* étant régulée par Srf (Carnac et al., 1998; L'honore et al., 2003, 2007), l'inactivation de Srf dans les cellules satellites pourrait avoir des conséquences sur leur efficacité d'entrée en différenciation.

Afin de tester cette hypothèse, nous avons tout d'abord examiné l'efficacité d'entrée en différenciation des myoblastes mutants. Pour cela, nous avons compté le nombre de cellules exprimant Myogénine 7 jours après le début de la période d'hypertrophie compensatoire ; nous n'avons pas observé de différence entre contrôles et mutants (Figure 44A et B).

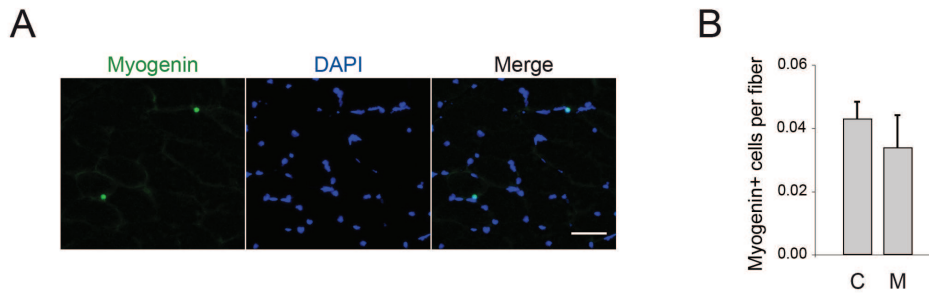


Figure 44 : nombre de cellules Myogénine+ après 7 jours d'hypertrophie compensatoire

(A) Immunomarquage de Myogénine (Santa Cruz) illustrant des cellules satellites entrées en différenciation (Myogénine+) réalisé sur un *Plantaris* de souris contrôle $Srf^{flox/flox}$, après 7 jours d'hypertrophie compensatoire. (Barre d'échelle, 50 μ m) (B) Nombre de noyaux Myogénine+ par fibre dans les *Plantaris* de souris adultes mâles et femelles contrôles $Srf^{flox/flox}$ (C) et mutants $Pax7-Cre-ER^{T2} : Srf^{flox/flox}$ (M), après 7 jours d'hypertrophie compensatoire (n=4 par groupe). Les données sont les moyennes \pm SEM.

Nous avons également compté le nombre de cellules exprimant Myogénine 4 jours après injection de cardiotoxine. Comme dans le contexte de l'hypertrophie compensatoire, les résultats obtenus indiquent que les muscles des souris contrôles et mutants présentent la même quantité de cellules positives pour Myogénine (Figure 45A et B). Par ailleurs, un immunomarquage de la laminine montre que, 4 jours après induction de la régénération, le nombre et la taille des fibres néoformées immatures sont semblables entre souris contrôles et mutants (Figure 45C). Néanmoins, un immunomarquage de la myosine embryonnaire (embMHC) semble montrer que, chez les animaux mutants, les fibres néoformées présentent une certaine irrégularité dans le marquage de la myosine embryonnaire (Figure 45C). Ces résultats indiquent que les premières étapes de la différenciation des myoblastes KO pour *Srf* ne paraissent pas touchées par l'absence de *Srf*. Cependant, le profil d'expression de la myosine embryonnaire suggère que l'altération de la régénération des mutants observée 14 jours après injection de cardiotoxine (Figure 40) pourrait être initiée durant la différenciation tardive des cellules invalidées pour *Srf*.

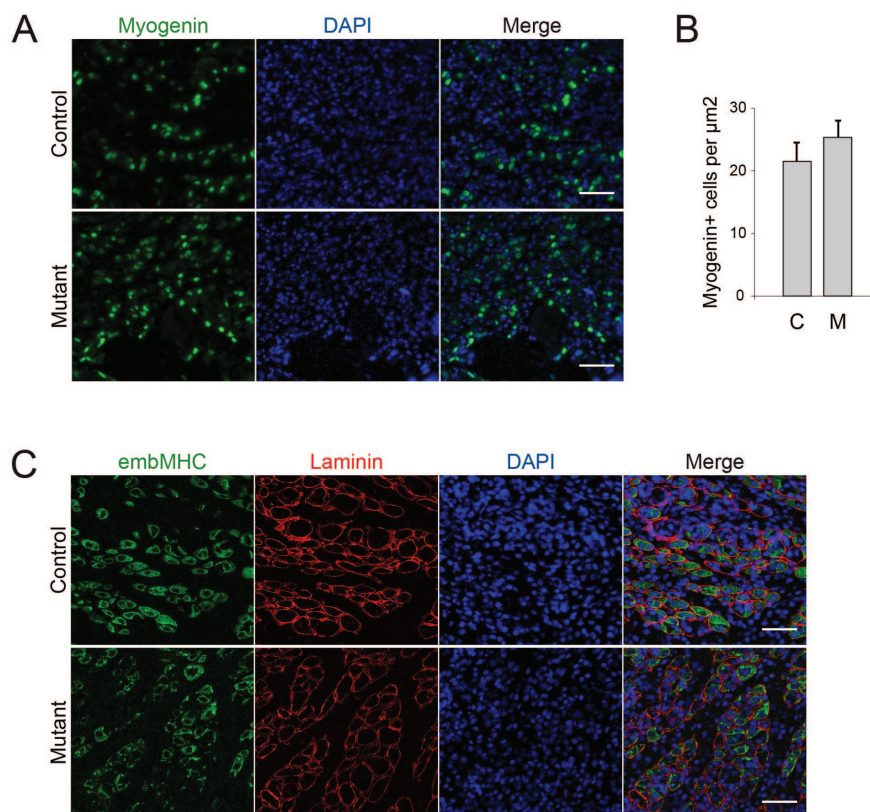


Figure 45 : altération de la différenciation tardive des cellules satellites dépourvues de Srf ?

(A) Immunomarquage de Myogénine (Santa Cruz) réalisé sur des TA de souris adultes mâles contrôles $\text{Srf}^{\text{flox/flox}}$ et mutantes $\text{Pax7-Cre-ER}^{\text{T2}} : \text{Srf}^{\text{flox/flox}}$, 4 jours après injection de cardiotoxine. (Barre d'échelle, 50 μm) (B) Nombre de noyaux Myogénine+ par μm^2 dans les TA de souris adultes mâles contrôles $\text{Srf}^{\text{flox/flox}}$ (C) et mutantes $\text{Pax7-Cre-ER}^{\text{T2}} : \text{Srf}^{\text{flox/flox}}$ (M), 4 jours après injection de cardiotoxine (n=4 par groupe). Les données sont les moyennes \pm SEM. (C) Immunomarquage de la myosine embryonnaire (embMHC, Alexis Biochemicals) et de la laminine (Sigma) réalisé sur des TA de souris adultes mâles contrôles $\text{Srf}^{\text{flox/flox}}$ et mutantes $\text{Pax7-Cre-ER}^{\text{T2}} : \text{Srf}^{\text{flox/flox}}$, 4 jours après injection de cardiotoxine. (Barre d'échelle, 50 μm)

f. L'absence de Srf dans les cellules satellites induit un défaut de fusion

Dans le but de déterminer la cause de l'absence d'hypertrophie musculaire des muscles dont les cellules satellites sont dépourvues de Srf, nous avons analysé la fusion des myoblastes contrôles et mutants aux fibres musculaires. Pour cela, nous avons compté le nombre de noyaux situés à l'intérieur des fibres après 7 et 21 jours d'hypertrophie compensatoire. En effet, le nombre de noyaux par fibre reflète l'efficacité du processus de fusion des myoblastes aux fibres préexistantes. Alors que le nombre de noyaux par fibre augmente chez les contrôles au cours de l'hypertrophie compensatoire, il reste constant chez les mutants, suggérant un défaut de fusion (Figure 46A et B).

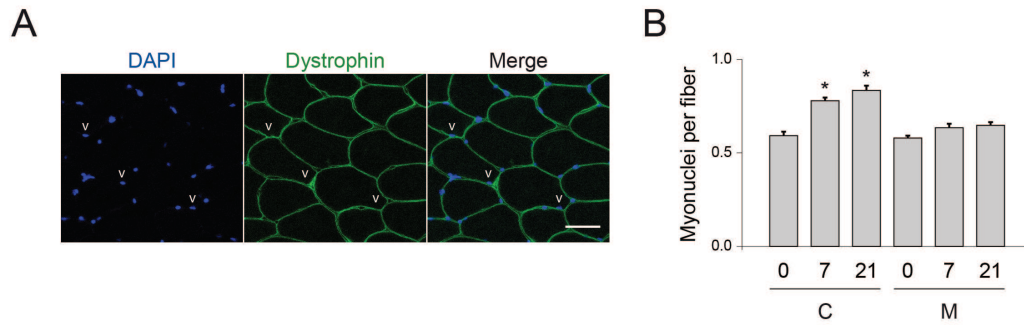


Figure 46 : la délétion de *Srf* dans les cellules satellites provoque un défaut de fusion des cellules aux fibres préexistantes

(A) Immunomarquage de la dystrophine (Leica), illustrant des noyaux situés à l'intérieur des fibres (flèches), réalisé sur un *Plantaris* de souris contrôle $Srf^{flox/flox}$, après 7 jours d'hypertrophie compensatoire. (Barre d'échelle, 50 μ m) (B) Nombre de noyaux par fibre dans les *Plantaris* de souris adultes mâles et femelles contrôles $Srf^{flox/flox}$ (C) et mutants Pax7-Cre-ER^{T2} : $Srf^{flox/flox}$ (M), avant et après 7 et 21 jours d'hypertrophie compensatoire (n=3 minimum par groupe). Les données sont les moyennes \pm SEM. *, $p < 0.05$ versus *Plantaris* contrôle avant hypertrophie compensatoire (0)

2. Conclusion

Grâce à l'hypertrophie compensatoire et à la régénération musculaire, deux modèles activant la myogenèse adulte, et à un modèle de knock-out conditionnel et inducible de *Srf* dans les cellules satellites, nous avons pu commencer à étudier le rôle de *Srf* dans ces cellules. Nous avons montré que l'expression de *Srf* dans les cellules satellites est nécessaire à la croissance musculaire au cours du phénomène d'hypertrophie compensatoire. L'incapacité des muscles mutants à s'hypertrophier nous permet également de répondre à la controverse concernant la nécessité de l'intervention des cellules satellites au phénomène d'hypertrophie induite par surcharge.

Les expériences que nous avons réalisées indiquent que les étapes de prolifération et de différenciation précoce ne sont pas touchées par l'absence de *Srf* dans les myoblastes. En revanche, les myoblastes dépourvus de *Srf* semblent incapables de fusionner aux fibres musculaires préexistantes, ce qui pourrait expliquer l'incapacité des muscles des souris mutantes à s'hypertrophier en réponse à l'augmentation de la charge mécanique.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Le muscle squelettique adulte est un tissu capable de s'adapter à la demande fonctionnelle et, au commencement de ma thèse, des travaux antérieurs réalisés dans l'équipe avaient établi un lien entre Srf et plasticité musculaire. Il avait notamment été montré qu'il est nécessaire à l'hypertrophie induite par surcharge de travail (Guerci et al., 2012). L'objectif de ma thèse était de poursuivre l'exploration de l'implication de Srf dans la plasticité musculaire en étudiant sa fonction dans le processus d'atrophie musculaire et son rôle dans les cellules satellites.

I. Srf, un médiateur de la mécano-transduction dans le tissu musculaire

Le muscle squelettique est un organe hautement plastique, dont la capacité à s'adapter à la demande fonctionnelle repose sur son efficacité à interpréter des signaux mécaniques et à les traduire en signaux biochimiques. A l'heure actuelle, les molécules permettant d'adapter le programme transcriptionnel à une variation des forces mécaniques appliquées à la cellule restent méconnues.

Des travaux antérieurs réalisés dans l'équipe ont mis en évidence un rôle possible de Srf dans la médiation de la mécano-transduction. En effet, l'équipe a démontré *in vivo* que Srf n'est requis pour le processus d'hypertrophie musculaire que lorsque celui-ci est dû à une augmentation des forces mécaniques : l'absence de Srf empêche le muscle de s'hypertrophier suite à une surcharge de travail alors qu'elle n'a aucun effet sur l'hypertrophie provoquée par l'électroporation d'une forme constitutive d'Akt (Guerci et al., 2012).

L'un des objectifs de ma thèse était de confirmer le rôle soupçonné de Srf dans la mécano-transduction. En utilisant des modèles d'atrophie musculaire induite par différents stimuli, j'ai déterminé que l'activité de Srf est diminuée lorsque l'atrophie est due à un arrêt de l'activité mécanique (modèles d'atrophie par dénervation, ténotomie et immobilisation) alors qu'elle reste inchangée lorsque l'atrophie est due à une réduction de l'apport en nutriments (modèle de restriction calorique). Par ailleurs, grâce à des modèles de perte et de gain de fonction de Srf, j'ai également établi que le niveau d'activité de Srf est directement lié au taux d'atrophie musculaire. Mes travaux confirment que Srf est un médiateur de la mécano-transduction au sein du muscle squelettique adulte. La provenance des signaux interprétés par Srf au cours de l'atrophie musculaire induite par arrêt de la contraction et la traduction de ces signaux par Srf seront discutées dans les parties suivantes.

II. Causes de la diminution d'activité de Srf due à l'arrêt de l'activité mécanique

1. Rôle de l'absence d'étirement

Au cours de nos travaux, nous avons utilisé trois modèles d'atrophie due à l'inactivité : la dénervation, la ténotomie et l'immobilisation. La dénervation est un modèle d'atrophie musculaire impliquant un arrêt de l'étirement et de la contraction des muscles provoqué par la suppression de l'influx nerveux. Dans le modèle de ténotomie, la section d'un des tendons du muscle supprime le phénomène d'étirement mais permet la contraction et maintient l'influx nerveux. Enfin, l'immobilisation par agrafe est un modèle où le TA est maintenu dans une position fixée, empêchant l'étirement. Dans ce modèle, comme dans le modèle de ténotomie, l'influx nerveux est maintenu et le TA peut se contracter.

Nos travaux ont montré que ces trois modèles d'atrophie musculaire conduisent à une diminution de l'activité de Srf. Leur comparaison indique que la baisse d'activité de Srf serait due à l'absence d'étirement et non à la suppression de l'absence d'influx nerveux ou de la contraction musculaire. Ainsi, l'activité de Srf serait plutôt contrôlée par l'étirement que par le couplage excitation/contraction. Afin de le confirmer, nous projetons de tester si l'étirement passif est suffisant pour stimuler l'activité de Srf. Pour cela, nous allons soumettre les GP de souris anesthésiées et précédemment dénervées à des cycles étirement/raccourcissement comme décrit (Maas et al., 2003).

2. Régulation de l'activité de Srf par la voie actine/Mrtfs

a. Modulation de la voie actine/Mrtfs/Srf au cours de l'atrophie musculaire due à l'inactivité

Afin d'élucider le mécanisme par lequel l'activité de Srf est diminuée au cours de l'atrophie musculaire induite par inactivité, nous nous sommes intéressés aux partenaires de Srf, et en particulier à ses cofacteurs Mrtfs. En effet, il a été décrit que la famille de petites GTPases Rho et la dynamique de l'actine contrôlent l'activité de Srf *via* la régulation de la localisation des Mrtfs (Miralles et al., 2003). Par ailleurs, il a été montré *in vitro* que l'application d'une force sur des fibroblastes et l'arrêt du battement de cardiomyocytes provoquent une délocalisation de Mrtf-A, établissant

un lien entre stress mécanique et activité de Srf (Kuwahara et al., 2010; McGee et al., 2011; Zhao et al., 2007).

Nos résultats montrent que l'arrêt de l'activité mécanique provoque une délocalisation de Mrtf-A du noyau vers un espace péri-nucléaire et que cette délocalisation est spécifique de l'inactivité puisqu'elle n'apparaît pas suite à la restriction calorique. La localisation des Mrtfs est bien documentée comme étant régulée par l'actine monomérique, qui, en plus de favoriser l'export des Mrtfs du noyau, inhibe leur import dans ce compartiment cellulaire (Pawłowski et al., 2010; Vartiainen et al., 2007). Grâce à un marquage à la DNase I, j'ai mis en évidence une augmentation de la quantité d'actine G dans les noyaux des fibres en réponse à la dénervation. Tout comme la délocalisation de Mrtf-A et la baisse d'activité de Srf, cette accumulation nucléaire d'actine monomérique n'est pas visible lors de la restriction calorique, appuyant le modèle selon lequel ces événements seraient spécifiques de l'inactivité.

Nous projetons d'analyser la localisation de l'actine G *in vitro*, dans des myotubes qui se contractent ou dont la contraction a été stoppée par l'ajout d'une drogue au milieu de culture, comme cela est pratiqué sur les cultures de cardiomyocytes avec le 2,3-butanedione monoxime, qui permet le découplage excitation/contraction, ou encore le vérapamil, un antagoniste du calcium (Lange et al., 2005; Lubic et al., 1995).

b. Provenance des particules d'actine

La provenance des particules d'actine accumulées dans le noyau suite à l'arrêt de l'activité mécanique reste à éclaircir ; toutefois, j'ai réfuté l'hypothèse selon laquelle cette accumulation d'actine monomérique serait due à la modulation de l'activité de Srf. En effet, certaines protéines régulant la dynamique de l'actine figurant parmi les gènes cibles de Srf, la variation de l'activité de Srf aurait pu être la cause d'une dérégulation de la balance actine polymérisée / actine monomérique. Cependant, par l'analyse de la quantité d'actine G nucléaire dans des modèles où l'activité de Srf est artificiellement diminuée (modèle de KO de Srf et modèle d'inhibition de l'interaction Mrtf-A/Srf *via* l'injection de CCG-1423) ou augmentée (modèle d'injection d'AAV-SRFVP16), j'ai démontré que la modulation de l'activité de Srf n'entraîne pas de variations de la quantité d'actine G nucléaire. Ainsi, l'accumulation de particules d'actine monomérique dans le noyau est causée par l'arrêt de l'activité mécanique et non par la diminution de l'activité de Srf.

Les particules d'actine monomériques pourraient provenir du cytoplasme des fibres. Ceci est appuyé par la démonstration récente du transport actif de l'actine entre les compartiments cytoplasmique et nucléaire : l'actine est importée dans les noyaux grâce à l'importine 9 et à la cofiline, et en est exportée par l'exportine 6 et la profiline (Dopie et al., 2012; Stüven et al., 2003). Le transport de l'actine entre le cytoplasme et le noyau est décrit comme un processus dynamique et constant, dont les taux d'import et d'export sont dépendants de la quantité d'actine G disponible (Dopie et al., 2012). L'arrêt de l'activité mécanique pourrait avoir pour conséquence d'altérer les taux d'export et/ou d'import de l'actine monomérique, causant ainsi une accumulation d'actine G dans le noyau des fibres.

D'autre part, la polymérisation de l'actine est influencée par RhoA et Rac1, entre autres, dont l'activité est notamment contrôlée par la signalisation intégrine, qui traduit une force appliquée à la cellule en un réarrangement du cytosquelette (Huveneers and Danen, 2009; Hynes, 2002). On peut proposer le mécanisme suivant : l'arrêt de la contraction musculaire serait relayée par les intégrines, qui, *via* les GTPases Rho, entraîneraient une modulation de la polymérisation de l'actine. Un plus grand nombre de particules d'actine G serait importé dans le noyau et, associé à une altération de l'export de l'actine monomérique, pourrait expliquer l'accumulation de particules d'actine G observée.

Enfin, les particules d'actine G pourraient provenir du noyau lui-même. En effet, il existe un phénomène nucléaire de polymérisation de l'actine, et certains médiateurs de la polymérisation de l'actine, tels que Rac1, sont détectés dans le noyau (Belin et al., 2013; Bettinger et al., 2004; Gieni and Hendzel, 2009; McDonald et al., 2006). En outre, une étude récente a montré, pour la première fois, un changement de la dynamique de l'actine nucléaire en réponse au sérum (Baarlink et al., 2013). Sur des fibroblastes en culture, l'équipe montre une polymérisation nucléaire de l'actine, *via* les formines mDia1 et mDia2, en réponse à une stimulation au sérum. Ainsi, l'accumulation d'actine monomérique que nous observons suite à la dénervation pourrait être causée par une altération du processus de polymérisation de l'actine nucléaire en réponse à l'inactivité. Il serait intéressant de tester la présence de formines nucléaires dans les fibres musculaires, par exemple en purifiant des noyaux et en hybridant des anticorps dirigés contre les formines aux extraits protéiques obtenus à partir de ces noyaux.

c. Isoforme d'actine accumulée suite à la dénervation

Chez les Mammifères, il existe 6 isoformes d'actine, codées par différents gènes, dont les séquences ne varient que de quelques acides aminés (Perrin and Ervasti, 2010). L' α -actine squelettique, l' α -actine cardiaque, l' α -actine lisse et la γ -actine lisse sont spécifiques des muscles squelettiques, du cœur et des muscles lisses. Les deux autres isoformes d'actine, la β -actine et la γ -actine, sont ubiquitaires. La β -actine est l'isoforme d'actine prédominante dans les noyaux et est notamment impliquée dans la transcription et dans le remodelage de la chromatine (Hofmann et al., 2004; Hu et al., 2004; Visa and Percipalle, 2010). Grâce à des centrifugations différentielles, une étude récente a montré qu'au sein du muscle squelettique, l' α -actine squelettique et la γ -actine sont distribuées différemment selon les compartiments cellulaires et qu'elles sont toutes deux présentes sous forme soluble (actine monomérique) (Gokhin and Fowler, 2011). Ceci appuie l'hypothèse selon laquelle les isoformes d'actine pourraient avoir des fonctions et des dynamiques différentes.

Nous souhaitons caractériser l'isoforme d'actine dont nous observons une accumulation suite à la dénervation. Pour cela, nous prévoyons de fractionner l'actine soluble et polymérisée en réalisant des centrifugations différentielles, comme décrit précédemment (Gokhin and Fowler, 2011). Nous pourrions également purifier des noyaux et, par ultracentrifugation, récupérer la fraction d'actine soluble. Après isolation de cette fraction, nous déterminerons quelle(s) isoforme(s) d'actine est (sont) accumulée(s) dans les noyaux des fibres suite à la dénervation grâce à des anticorps spécifiques des différentes isoformes d'actine. En outre, nous avons pour projet d'électroporer des plasmides permettant l'expression d'isoformes d'actine tagguées. Nous localiserons les particules d'actine tagguées après dénervation des souris électroporées, dans le but de déterminer quelle(s) isoforme(s) d'actine présente(nt) une accumulation nucléaire en réponse à la dénervation.

3. Rôle de la signalisation associée aux molécules d'adhérence

Les intégrines sont des récepteurs transmembranaires d'adhésion représentant le composant majeur des adhésions focales. Grâce à leur association avec les filaments d'actine du cytosquelette cellulaire, elles permettent d'établir une connexion entre le milieu intracellulaire et son environnement direct, comprenant généralement la matrice extracellulaire (ECM) et les cellules voisines (Hynes, 2002). En outre, elles peuvent induire une réorganisation du cytosquelette d'actine par la régulation des Rho GTPases RhoA et Rac1 par des kinases telles que la focal

adhesion kinase (FAK) et l'integrin-linked kinase (ILK) (Huveneers and Danen, 2009; Olson and Nordheim, 2010). Ainsi, la signalisation intégrine a la capacité de réguler la polymérisation de l'actine en réponse à l'application de forces mécaniques à l'environnement de la cellule. Il a par ailleurs été démontré sur des cultures de fibroblastes que la transduction du signal par les intégrines en réponse à l'application d'une force peut activer la voie actine/Mrtfs/Srf (Zhao et al., 2007).

Les cadhérines appartiennent à une autre classe de protéines transmembranaires, notamment impliquées dans les contacts cellule-cellule au niveau de structures appelées jonctions adhérentes. Elles sont également liées au cytosquelette par leur association avec les protéines de la famille des caténines. Des études ont montré que la dynamique d'assemblage / désassemblage des jonctions adhérentes active la voie Mrtfs/Srf *via* certaines Rho GTPases (Busche et al., 2008; Sebe et al., 2008).

Nos travaux ont permis de montrer que l'activité de Srf diminue en réponse à l'arrêt d'activité mécanique induit par dénervation, ténotomie et immobilisation. En particulier, les résultats obtenus avec le modèle d'immobilisation suggèrent que l'élément induisant la baisse d'activité de Srf pourrait être l'absence d'étirement, ce qui indique une possible implication des molécules d'adhésion. Cette hypothèse est soutenue par le résultat d'expériences préliminaires réalisées par une équipe collaborant avec la nôtre (Sylvie Hénon, Université Paris Diderot) : l'application d'une force sur des myoblastes C2C12 exprimant Mrtf-A-GFP grâce à l'utilisation de microbilles enrobées de fibronectine (une protéine de l'ECM) et activées par des pinces magnétiques est suffisante à induire la translocation nucléaire de Mrtf-A-GFP. Afin de valider l'implication des intégrines, des cadhérines et de leurs molécules effectrices associées, nous pourrions analyser les conséquences sur la localisation de Mrtf-A, sur l'activité de Srf et sur le taux d'atrophie musculaire de modèles de perte de fonction reposant sur l'électroporation de siRNA ou de dominants négatifs de ces molécules.

4. Contrôle de l'activité de Srf par la titine et MuRF2 ?

Diverses études ont permis d'établir un lien entre Srf et la famille muscle-spécifique des E3 ubiquitine ligases MuRF. Cette famille a été découverte en 2000 par un screen double-hybride révélant l'interaction de MuRF3 avec Srf (Spencer et al., 2000). En 2005, un autre screen double-hybride identifie l'interaction de MuRF2 avec Srf (Lange et al., 2005). Les auteurs de cette étude démontrent dans des cardiomyocytes néonataux que la titine, une protéine sarcomérique géante possédant un domaine tyrosine kinase capable de détecter l'activité mécanique,

contrôle la localisation de MuRF2 et que l'arrêt du battement des cardiomyocytes provoque une translocation nucléaire de MuRF2 et une accumulation cytoplasmique de Srf. Ainsi, cette étude montre *in vitro* que, suite à un arrêt de l'activité mécanique, MuRF2 est à l'origine d'une diminution de l'activité transcriptionnelle de Srf par la délocalisation de ce dernier. Cette conclusion est étayée par une étude récente au cours de laquelle des rats ont été soumis à un modèle d'atrophie par immobilisation reproduisant les conditions dans lesquelles se trouvent les patients des services de soins intensifs (Ochala et al., 2011). Neuf jours après le début de la période d'immobilisation, les auteurs de cette étude constatent une accumulation de MuRF2 et de Srf dans l'espace péri-nucléaire, accumulation qui reste visible après 14 jours d'immobilisation. Cette accumulation n'est cependant pas détectable 4 jours après le début de la période d'immobilisation, où MuRF2 et Srf sont tous les deux nucléaires. Ces différents travaux nous ont menés à émettre l'hypothèse selon laquelle une délocalisation de Srf, due à l'arrêt de l'activité musculaire, pourrait être en partie responsable de la diminution de l'activité de Srf que nous avons démontrée. Cependant, 7 jours après dénervation, nous montrons que la localisation de Srf est toujours nucléaire dans les muscles dénervés. Il n'est toutefois pas exclu que Srf soit délocalisé après cette période, d'autant que la délocalisation de Srf constatée chez les rats immobilisés n'est visible qu'après 9 jours d'immobilisation.

III. Traduction des signaux interprétés par Srf

1. Régulation de la transcription des gènes codant pour des protéines sarcomériques

L'atrophie musculaire peut être induite par différents types de stimuli, tels que l'inactivité, l'immobilité due à un déficit neuro-moteur ou encore la malnutrition. Dans tous les cas, la synthèse protéique est diminuée et la dégradation est augmentée. En plus de cette modification de la balance entre anabolisme et catabolisme, un certain nombre de travaux décrit une modification de la transcription de gènes codant pour des protéines sarcomériques suite à un arrêt de l'activité mécanique (Bialek et al., 2011; Giger et al., 2009; Lamon et al., 2009; Sacheck et al., 2007). Srf ayant pour cible un certain nombre de ces gènes, nous avons émis l'hypothèse selon laquelle l'activité de Srf pourrait être réduite au cours de ce type d'atrophie musculaire afin de réguler leur expression.

Nous avons soumis des souris à des protocoles d'atrophie musculaire induite par dénervation, par ténotomie et par immobilisation, et nous avons conclu que, lors de l'atrophie musculaire induite par arrêt de l'activité mécanique, l'activité de Srf est réduite. Cette baisse d'activité entraîne une diminution de la transcription des gènes cibles de Srf codant pour des protéines sarcomériques, comme nous l'avons montré avec *Acta1*.

La diminution de l'activité de Srf participe donc au processus d'atrophie musculaire en réduisant la transcription des gènes cibles de Srf, et notamment de ceux qui codent pour des protéines sarcomériques. Notons que cette adaptation du programme transcriptionnel par Srf est spécifique d'un arrêt de la contraction, puisque l'activité de Srf et le nombre de transcrits d'*Acta1* ne varient pas dans le cas de l'atrophie musculaire induite par restriction calorique, ce qui est cohérent avec une étude montrant que l'expression des gènes codant pour les protéines du système contractile n'est pas altérée dans les cas d'atrophie musculaire due à une période de jeûne, à un diabète ou à une urémie induite par néphrectomie (Lecker et al., 2004).

Les résultats obtenus grâce aux modèles de perte et de gain de fonction de Srf renforcent la conclusion selon laquelle Srf participe à l'atrophie par la régulation transcriptionnelle de ses cibles : la délétion de Srf provoque une diminution du nombre de transcrits d'*Acta1* et une atrophie aggravées, alors que l'expression d'une forme constitutive de Srf donne lieu à un maintien du nombre de transcrits d'*Acta1* et à une résistance à l'atrophie.

Dans l'objectif d'évaluer la contribution de la baisse de transcription d'*Acta1* à l'atrophie musculaire, nous avons pour projet de déterminer si une surexpression de l'actine permettrait aux muscles de résister à l'atrophie. Les différentes isoformes d'actine étant capables de se compenser *in vivo* (Belyantseva et al., 2009; Perrin and Ervasti, 2010), nous allons utiliser le modèle de souris transgéniques permettant la surexpression d' α -actine cardiaque de façon conditionnelle et inducible (modèle HSA-Cre-ER^{T2} : CMV-CAT^{flox/flox}-Actc1) dont nous disposons déjà au laboratoire. Nous soumettrons des souris contrôles et mutantes à une procédure d'atrophie induite par dénervation et nous déterminerons si la compensation de la baisse de transcription d'*Acta1* par la surexpression d'*Actc1* permet de réduire le taux d'atrophie musculaire.

2. Influence sur la fonction mitochondriale

Le phénomène d'atrophie musculaire est associé à des variations de la morphologie et de la fonction des mitochondries. De manière intéressante, ces variations apparaissent spécifiques du stimulus induisant l'atrophie. En effet, une période d'inactivité prolongée provoque notamment une dysfonction de la respiration mitochondriale et un accroissement de la quantité de ROS produits, tandis qu'une période de restriction calorique promeut la biogenèse mitochondriale et est marquée par une augmentation de la production d'ATP et à une synthèse de ROS limitée, entre autres (Abadi et al., 2009; Adhietty et al., 2007; Civitarese et al., 2007; Kavazis et al., 2009; López-Lluch et al., 2006; Muller et al., 2007; Nisoli et al., 2005; Powers et al., 2012). La spécificité de l'altération de la fonction mitochondriale en fonction du stimulus provoquant l'atrophie nous a conduits à émettre l'hypothèse selon laquelle la baisse d'activité de Srf provoquée par l'arrêt de l'activité mécanique pourrait influencer la fonction mitochondriale.

Afin de déterminer si Srf joue en effet un rôle sur la fonction mitochondriale, nous avons tout d'abord comparé l'expression de gènes codant pour des E3 ubiquitine ligases mitochondriales, tels que *March5*, dans des muscles contrôles et mutants dénervés. Les résultats obtenus suggèrent que l'absence de Srf ne conduit pas à une dégradation plus importante des mitochondries en réponse à la dénervation, ce qui a été confirmé par l'analyse de la quantité d'ADN mitochondrial dans des muscles de souris contrôles ou ayant reçu des injections de CCG-1423. En revanche, nous avons pu mettre en évidence une diminution significative de la quantité de protéines OPA1 et MFN2 dans les muscles mutants dénervés par rapport aux muscles contrôles dénervés. Ces résultats suggèrent que l'absence de

Srf pourrait avoir pour conséquence de diminuer le processus de fusion mitochondriale suite à la dénervation.

OPA1 est un effecteur crucial du phénomène de fusion mitochondriale ; l'étude des répercussions d'une perte de fonction d'OPA1 a permis de montrer que cette protéine joue également le rôle d'inhibiteur de la fission (Olichon et al., 2003). Ainsi, en plus de diminuer le processus de fusion mitochondriale, l'absence de Srf pourrait donc augmenter la fragmentation des mitochondries. Ceci est appuyé par une étude récente ayant révélé un lien entre Srf et fonction mitochondriale : les mitochondries de neurones dépourvus de Srf sont fragmentées et leur fonction est altérée, alors que la surexpression d'une forme constitutivement active de Srf (SRFVP16) stimule le développement et l'efficacité du réseau mitochondrial (Beck et al., 2012). Les auteurs de cette étude montrent que ces effets sont imputables à la cofiline, cible de Srf, et au rôle qu'elle joue dans la dynamique de l'actine, établissant la voie Srf/cofiline/actine comme régulateur de la fragmentation mitochondriale. Par ailleurs, il a été démontré que la fission a des conséquences directes sur l'atrophie musculaire. En effet, une inhibition de la fission protège de l'atrophie, alors que la surexpression de protéines de fission est suffisante pour activer un programme atrophique (Romanello et al., 2010). Par conséquent, la diminution de l'activité de Srf en réponse à l'inactivité pourrait contribuer à l'atrophie musculaire en influençant les processus de fusion et de fission des mitochondries.

Une altération de la balance entre fusion et fission mitochondriales pourrait-elle expliquer l'aggravation de l'atrophie musculaire observée en absence de Srf ? Une revue de la littérature permet de trouver des arguments convaincants pour répondre à cette question. Il est communément admis que l'arrêt de l'activité musculaire entraîne un stress oxydant conduisant à la production de ROS par les mitochondries (Abruzzo et al., 2010; Chowdhury et al., 2009; Kondo et al., 1991; Muller et al., 2007). Les ROS peuvent contribuer à l'atrophie musculaire en activant les calpaïnes par la perturbation de l'homéostasie du calcium, en activant la caspase 3 ou en promouvant le catabolisme par le protéasome puisqu'elles stimulent la conjugaison d'ubiquitine aux protéines (Li et al., 2003c; Powers et al., 2010). De plus, une étude récemment publiée montre qu'un traitement antioxydant confère aux muscles traités une résistance à l'atrophie induite par immobilisation (Talbert et al., 2013).

L'aggravation de l'atrophie pourrait être causée par une production de ROS plus importante chez les mutants, hypothèse soutenue par les deux points suivants : (1) De par la proximité de l'ADN mitochondrial à la chaîne de transport des électrons produisant les ROS, l'absence d'histones protégeant sa structure et l'inefficacité de

ses systèmes de réparation, le taux de mutations de l'ADN mitochondrial est environ 10 fois plus élevé que celui de l'ADN nucléaire (Sato et al., 2006). Malgré ce nombre élevé de mutations, il a été montré que les cellules sont protégées d'une dysfonction mitochondriale par le procédé de « complémentation mitochondriale », au cours duquel les mitochondries échangent de l'ADN après fusion de leurs membranes (Ono et al., 2001). Or, dans les muscles mutants dénervés, nous avons détecté une forte diminution des protéines de fusion OPA1 et MFN2, suggérant que le processus de fusion mitochondriale est altéré dans ces muscles. De cette façon, dans un muscle dépourvu de Srf, les dommages à l'ADN mitochondrial, causés par la production de ROS due à la dénervation, ne seraient pas réparables, ce qui pourrait entraîner une dysfonction mitochondriale et la production d'une plus grande quantité de ROS. (2) Nos résultats indiquent que la diminution de la quantité d'ADN mitochondrial en réponse à la dénervation est significativement moins importante dans les muscles où l'activité de Srf est inhibée par injection de CCG-1423. Il n'est pas exclu que cela soit dû à une tentative de compensation du défaut de fusion engendré par l'inhibition de l'activité de Srf. Une plus grande quantité d'ADN mitochondrial peut signifier un plus grand nombre de mitochondries et/ou une capacité de réponse au stress oxydatif plus importante, d'où une production de ROS accrue.

Il est donc permis d'envisager que, dans les cas d'inhibition de l'activité de Srf par la délétion de Srf ou par l'administration de CCG-1423, l'aggravation de l'atrophie soit due à une augmentation de la production de ROS directement liée à l'altération du processus de fusion mitochondriale. Il serait donc intéressant de mesurer la quantité de ROS dans les muscles contralatéraux et dénervés des souris contrôles, mutantes et injectées avec le composé CCG-1423. La quantité de ROS libérés peut être évaluée *ex vivo* par des mesures biochimiques de l'activité enzymatique mitochondriale grâce à des kits commerciaux, comme décrit (Min et al., 2011). Par ailleurs, nous pourrions traiter les muscles de ces souris avec un antioxydant et déterminer si ce traitement entraîne une certaine résistance à l'atrophie.

En conclusion, nous pouvons proposer le modèle suivant : la diminution de l'activité de Srf, déclenchée par un arrêt de l'activité mécanique, contribuerait à l'atrophie musculaire en altérant la balance entre les phénomènes de fusion et de fission mitochondriales, notamment par la diminution d'OPA1, en privilégiant le processus de fission mitochondriale, connu pour contribuer à l'atrophie musculaire (Romanello et al., 2010). La validité de ce modèle pourrait être testée en quantifiant les protéines OPA1 et MFN2 dans les muscles injectés avec des AAV-SRFVFP16 : si le modèle

proposé est juste, la maintenance de l'activité de Srf par les AAV-SRFVP16 devrait maintenir les niveaux d'OPA1 et de MFN2, ce qui n'augmenterait pas le phénomène de fission mitochondriale et expliquerait la résistance à l'atrophie observée. Le modèle que nous proposons pourrait également être testé en comparant la quantité de protéines OPA1 et MFN2 dans les muscles de souris contrôles et mutantes soumises à une restriction calorique : en effet, Srf n'étant pas impliqué dans la restriction calorique, on ne devrait pas constater de différence de quantités d'OPA1 et de MFN2 entre les muscles de souris restreintes contrôles et mutantes. Dans tous les cas, nous souhaitons observer le réseau mitochondrial en microscopie électronique et/ou par marquage des mitochondries par des sondes fluorescentes de type MitoTracker (Invitrogen).

3. Régulation de l'autophagie ?

L'autophagie fait partie des mécanismes d'adaptation par lesquels les cellules répondent à des conditions de stress, dont un arrêt de l'activité musculaire (Bonaldo and Sandri, 2013). L'analyse du transcriptome de muscles de souris contrôles et mutantes, dénervées ou soumises à une période de restriction calorique, nous indique que plusieurs fonctions liées à l'autophagie sont spécifiquement augmentées dans les muscles mutants dénervés.

Afin de tester l'hypothèse selon laquelle l'aggravation de l'atrophie musculaire observée chez les souris mutantes pourrait être causée par une augmentation de l'autophagie, nous avons analysé le ratio LC3-II/LC3-I dans les muscles de ces souris. Suite à la dénervation, nous avons montré que les muscles mutants présentent une augmentation du ratio LC3-II/LC3-I plus importante que les muscles contrôles, suggérant que les muscles mutants contiennent un plus grand nombre d'autophagosomes (Mizushima and Yoshimori, 2007).

Toutefois, la protéine LC3-II étant à la fois produite et dégradée au cours de l'autophagie (Ju et al., 2010), il est nécessaire de confirmer ce résultat par d'autres approches. Pour cela, nous pourrions bloquer le flux autophagique dans les muscles dénervés par injection d'inhibiteurs de l'autophagie tels que la colchicine, la chloroquine ou la vinblastine. Ces molécules empêchent la maturation des autophagosomes en autolysosomes, provoquant une accumulation des autophagosomes (Ju et al., 2010). En injectant un inhibiteur de ce type à des souris contrôles et mutantes dénervées, nous pourrions mesurer la quantité de LC3-II réellement produite suite à la dénervation.

Si l'augmentation de la quantité de protéines LC3-II est validée, cela signifie que les muscles mutants pourraient être le siège d'une augmentation du flux autophagique, expliquant leur atrophie supérieure à celle des muscles contrôles. Afin de le vérifier, différentes approches sont possibles. D'une part, pour confirmer que les muscles mutants dénervés contiennent en effet un plus grand nombre d'autophagosomes, nous allons observer des muscles contrôles et mutants dénervés en microscopie électronique. Nous allons aussi quantifier la protéine cargo p62, qui lie les protéines ubiquitinylées à la protéine LC3-II, elle-même associée à la membrane interne des autophagosomes (Lamark et al., 2009b). Nous projetons également d'électroporer une construction LC3-GFP dans des muscles de souris contrôles et mutantes, que nous dénervons, et de réaliser un immunomarquage de la GFP et de p62 dans le but de visualiser les autophagosomes par des analyses microscopiques. D'autre part, nous pourrions suivre le flux autophagique en électroporant le plasmide mRFP-EGFP-LC3 (ptfLC3, Addgene) (Kimura et al., 2007) dans des muscles de souris contrôles et mutantes avant de les dénervés. Ce LC3 émet un signal fluorescent jaune, combinaison des signaux mRFP et EGFP, avant la fusion des autophagosomes avec les lysosomes. Lorsque les autophagosomes fusionnent avec les lysosomes, l'acidité de l'environnement supprime le signal EGFP. Ainsi, un signal jaune représente un autophagosome et un signal rouge indique un autolysosome. L'électroporation de ce plasmide à des souris contrôles et mutantes et leur dénervation permettrait de quantifier le nombre de vésicules jaunes et rouges et ainsi d'évaluer le flux autophagique.

Dans le cas où nous confirmerions que les muscles mutants dénervés sont sujets à un flux autophagique augmenté, il serait intéressant de quantifier le flux autophagique dans les muscles injectés avec des AAV-SRFVP16 et dénervés. En effet, un flux autophagique diminué dans ces muscles par rapport à des muscles contrôles dénervés démontrerait que la variation de l'activité de Srf influence directement le flux autophagique. Nous évaluerons également le flux autophagique en conditions de restriction calorique : si l'augmentation du flux autophagique est une conséquence de la baisse d'activité de Srf spécifique à l'arrêt de l'activité mécanique, l'absence de Srf en conditions de restriction calorique ne devrait pas l'influencer.

IV. Rôle de Srf dans les cellules satellites

L'hypertrophie musculaire constitue l'un des phénomènes d'adaptation du muscle squelettique : suite à un accroissement des signaux mécaniques, le muscle a la capacité de s'hypertrophier. Une étude réalisée par l'équipe dont je fais partie, et à laquelle j'avais contribué, a permis de démontrer que l'inactivation de Srf dans les fibres musculaires rend les muscles incapables de s'hypertrophier du fait d'un défaut de prolifération et de recrutement des cellules satellites aux fibres préexistantes. Afin de continuer à explorer le rôle de Srf dans l'hypertrophie musculaire, j'ai étudié le rôle de Srf dans les cellules satellites au cours de la myogenèse adulte. Pour ce faire, j'ai tiré parti d'un modèle de délétion conditionnelle et inducible de Srf dans les cellules satellites (modèle Pax7-Cre-ER^{T2}:Srf^{flox/flox}) que j'ai soumis à deux phénomènes mettant en jeu les cellules satellites : l'hypertrophie compensatoire et la régénération musculaire.

1. Altération de la régénération et de l'hypertrophie musculaires des muscles mutants

Nous avons soumis des souris contrôles et mutantes à un protocole de régénération musculaire par injection de cardiotoxine et nous avons observé, 14 jours après injection de cardiotoxine, que la délétion de Srf dans les cellules satellites induit une altération de la régénération musculaire. Cependant, on ne peut négliger le fait que, chez les souris mutantes, les fibres néoformées à partir de cellules satellites déficientes en Srf sont également dépourvues de Srf. L'équipe ayant démontré la présence d'un dialogue dépendant de Srf entre fibres et cellules satellites lors du phénomène d'hypertrophie musculaire (Guerci et al., 2012), nous pouvons supposer que, lors de la régénération, le fait que les fibres néoformées soient dépourvues de Srf participe à la gravité du phénotype observé chez les souris mutantes.

Grâce à un modèle d'hypertrophie compensatoire du *Plantaris* par ablation du *Gastrocnemius* et du *Soleus*, nous avons montré que ce type d'hypertrophie requiert l'expression de Srf par les cellules satellites. En effet, 21 jours après le début de la période d'hypertrophie compensatoire, les muscles mutants ne présentent aucune hypertrophie, contrairement aux muscles contrôles. Dans le but d'expliquer cette absence d'hypertrophie chez les mutants, nous avons décomposé la myogenèse adulte en ses différentes étapes afin de comprendre laquelle (lesquelles) est (sont) affectée(s) par la délétion de Srf.

2. Prolifération normale des myoblastes invalidés pour Srf

Srf comptant parmi ses gènes cibles certains IEG impliqués dans la prolifération cellulaire, tels que *c-fos* et *JunB*, nous avons émis l'hypothèse selon laquelle la délétion de Srf dans les cellules satellites pourrait diminuer leur efficacité à proliférer. Toutefois, la nécessité de la présence de Srf pour la prolifération cellulaire semble dépendre du type cellulaire : l'inactivation de Srf dans des cellules humaines d'artère coronaire inhibe leur prolifération et induit leur entrée en sénescence (Werth et al., 2010) alors que l'absence de Srf dans des kératinocytes ou des lymphocytes T n'altère pas leur prolifération mais conduit respectivement à des défauts d'adhésion et de différenciation ou de maturation (Fleige et al., 2007; Koegel et al., 2009).

Nos travaux montrent, pour la première fois *in vivo*, que Srf n'est pas nécessaire à l'étape de prolifération des myoblastes. En effet, nous avons démontré que, lors de l'hypertrophie compensatoire et de la régénération musculaire induite par injection de cardiotoxine, le taux de prolifération des myoblastes contrôles et mutants est le même. En outre, nos résultats sont confirmés par des expériences réalisées sur des cultures primaires de myoblastes (travaux de Voahangy Randrianarison) : la délétion de Srf dans ces myoblastes, due à leur infection par des adénovirus permettant l'expression d'une recombinase Cre, ne cause pas de variation de leur taux d'incorporation de BrdU.

Ces résultats contredisent une étude réalisée au laboratoire, et publiée en 1996, selon laquelle Srf est indispensable pour la prolifération des myoblastes (Soulez et al., 1996). Ce résultat avait été obtenu *in vitro* grâce à la transfection de cellules myogéniques C2C12 avec un ARN antisens dirigé contre Srf et inductible par la dexaméthasone. Cette divergence de résultats peut être expliquée par le modèle utilisé : les cellules C2C12 sont une lignée cellulaire et leur immortalisation peut conduire à des artéfacts, d'où le nombre croissant d'études utilisant des cultures primaires de myoblastes à faible passage pour les expériences *in vitro*.

3. Altération de la différenciation des myoblastes mutants?

L'entrée en différenciation des myoblastes est notamment dépendante de MyoD, qui contrôle la sortie du cycle cellulaire et l'expression de Myogénine (Halevy et al., 1995; Zanou and Gailly, 2013). Le gène *MyoD* faisant partie des cibles de Srf (Carnac et al., 1998; L'honore et al., 2003, 2007), nous avons émis l'hypothèse suivante : l'inactivation de Srf dans les cellules satellites pourrait conduire à un défaut d'entrée en différenciation dû à une sous-expression de *MyoD*. Néanmoins,

nos résultats montrent que l'entrée en différenciation n'est pas altérée puisque le nombre de cellules exprimant Myogénine est le même dans les muscles contrôles et mutants suite à l'hypertrophie compensatoire ou à la régénération. Il serait intéressant d'évaluer les conséquences de l'absence de Srf sur l'expression de MyoD dans ce contexte, par exemple en réalisant un immunomarquage de MyoD. Nous prévoyons un faible impact de la délétion de Srf sur MyoD car des analyses par qRT-PCR réalisées sur myoblastes contrôles ou invalidés pour Srf, en prolifération ou après 1 ou 3 jours de différenciation, ne révèlent pas de différence dans l'expression de MyoD ni de Myogénine dans les myoblastes mutants (expériences réalisées par V. Randrianarison).

Quatre jours après injection de cardiotoxine, nous avons observé que, chez les souris mutantes, la myosine embryonnaire marque le cytoplasme des fibres néoformées de façon irrégulière par rapport aux souris contrôles, chez lesquelles le marquage est beaucoup plus homogène. Srf ayant pour cible un grand nombre de protéines sarcomériques, son absence pourrait conduire à la formation de sarcomères désorganisés, ce qui expliquerait l'irrégularité du marquage que nous observons.

L'ensemble de ces résultats suggère que l'absence de Srf dans les myoblastes ne diminue pas leur efficacité d'entrée en différenciation mais qu'elle pourrait altérer leur différenciation tardive. Afin de le confirmer, nous pourrions notamment observer la structure des sarcomères des fibres néoformées en microscopie électronique.

4. Défaut de fusion des myoblastes dépourvus de Srf aux fibres préexistantes

a. Absence de fusion des myoblastes mutants aux fibres lors de l'hypertrophie compensatoire

Dans le but de déterminer si l'absence d'hypertrophie observée chez les souris mutantes s'explique par un défaut de fusion des myoblastes aux fibres préexistantes, nous avons compté le nombre de noyaux par fibre après 7 et 21 jours d'hypertrophie compensatoire. Les résultats obtenus indiquent qu'il reste constant chez les souris mutantes, contrairement aux souris contrôles chez lesquelles il augmente avec l'hypertrophie compensatoire. Ceci indique un défaut dans le processus de fusion des myoblastes dépourvus de Srf aux fibres. Nous proposons le modèle selon lequel le défaut de fusion des myoblastes KO pour Srf serait responsable de l'absence d'hypertrophie musculaire observée chez les souris mutantes après 3 semaines d'hypertrophie compensatoire.

Ce modèle va à l'encontre d'une étude récente démontrant que les cellules satellites ne sont pas requises pour le phénomène d'hypertrophie compensatoire (McCarthy et al., 2011). Grâce à un modèle d'ablation conditionnelle et inductible des cellules satellites dans le muscle squelettique adulte (modèle Pax7-DTA), les auteurs de cette étude montrent que 2 semaines après hypertrophie compensatoire, les muscles dépourvus de cellules satellites sont capables de s'hypertrophier de la même manière que les muscles contrôles. Il n'est cependant pas exclu qu'à des temps plus tardifs une différence soit visible entre les muscles sans cellules satellites et les muscles contrôles. En outre, cette étude contredit plusieurs travaux ayant montré que l'activité des cellules satellites est nécessaire à l'hypertrophie compensatoire de l'EDL après ablation du TA (Rosenblatt and Parry, 1992; Rosenblatt et al., 1994).

Un lien a été établi entre contribution des cellules satellites à l'hypertrophie et « efficacité » de l'hypertrophie. Il a été montré que les muscles de souris *Mstn*^{-/-} sont hypertrophiés par rapport à ceux des souris contrôles (McPherron et al., 1997). Ce phénomène se déroule sans la contribution des cellules satellites mais, dans ce cas, le domaine nucléaire (volume de cytoplasme par noyau) est augmenté et la force spécifique (définie comme la force relative à la taille du muscle) est diminuée (Amthor et al., 2007; Qaisar et al., 2012). Paradoxalement, les muscles de souris *Mstn*^{-/-} sont donc plus faibles que les muscles contrôles, malgré le fait qu'ils soient plus gros. Au contraire, l'hypertrophie de muscles surexprimant IGF1 est caractérisée par un ajout de noyaux aux fibres et un maintien de la taille du domaine nucléaire et de la force spécifique (Qaisar et al., 2012). Ainsi, les cellules satellites seraient requises pour le maintien du domaine nucléaire et de la force spécifique au cours de l'hypertrophie.

b. Anomalie d'adhérence en l'absence de Srf ?

Nos travaux mettent en évidence un défaut de fusion des myoblastes dépourvus de Srf aux fibres musculaires lors de l'hypertrophie compensatoire. Ce défaut pourrait être dû à une diminution de l'efficacité d'adhésion des myoblastes aux fibres. En effet, il a notamment été démontré, grâce à un modèle de cellules souches embryonnaires, que Srf est crucial pour l'assemblage des adhésions focales (Schratt et al., 2002). Les gènes cibles de Srf comptant un grand nombre de protéines membranaires, telles que des sous-unités d'intégrines (Miano et al., 2007a), le défaut de fusion que nous observons pourrait s'expliquer par la sous-expression de

certaines de protéines d'adhérence due à l'absence de Srf, provoquant une diminution de l'efficacité d'adhésion des myoblastes aux fibres.

D'une part, ce défaut pourrait être lié à la sous-expression de sous-unités des intégrines. Les intégrines sont des hétérodimères de sous-unités α et β . L'intégrine $\beta 1$, une cible connue de Srf, peut entre autres s'hétérodimériser avec les sous-unités $\alpha 1$, $\alpha 5$ et $\alpha 9$, qui sont également des cibles de Srf. L'invalidation de Srf dans les cellules satellites pourrait donner lieu à une sous-expression de ces sous-unités α et β , causant une inefficacité du phénomène d'adhésion précédant la fusion. Cette hypothèse est appuyée par différentes études démontrant que l'augmentation de l'expression des intégrines $\beta 1$ au moment de la différenciation des myoblastes est cruciale pour le processus de fusion (Madaro et al., 2011; Quach et al., 2009; Schwander et al., 2003).

D'autre part, le défaut de fusion que nous observons pourrait être lié à la sous-expression de syndecans : les syndecans 2 et 4 sont en effet des cibles de Srf (Miano et al., 2007a). Les syndecans permettent de stabiliser les interactions récepteur/ligand des intégrines au niveau des adhésions focales (Woods and Couchman, 2001). La délétion de Srf dans les cellules satellites pourrait entraîner une sous-expression des syndecans 2 et 4, participant à l'inefficacité de l'adhésion des myoblastes. Une étude réalisée sur des fibroblastes issus de souris syndecan-4^{-/-} a en effet démontré que ces fibroblastes présentent des défauts d'adhésion et de migration (Wilcox-Adelman et al., 2002). De plus, les cellules satellites syndecan-4^{-/-} sont incapables de régénérer un muscle et présentent des défauts de migration et de fusion *in vitro* (Cornelison et al., 2004).

Ainsi, le défaut de fusion que nous observons au cours de l'hypertrophie compensatoire chez les souris mutantes pourrait être dû à un défaut d'adhérence des myoblastes aux fibres lié à la sous-expression de certaines sous-unités α et β d'intégrines ou de syndecans. Il serait intéressant d'analyser l'expression de ces facteurs dans les myoblastes au cours de l'hypertrophie musculaire ainsi que d'évaluer l'efficacité d'adhésion et de migration des cellules satellites dépourvues de Srf.

5. Devenir des cellules

Lors de la myogenèse adulte, les cellules satellites activées entrent en prolifération ; certains myoblastes en prolifération entrent en différenciation tandis que d'autres sortent du cycle cellulaire et retournent à l'état quiescent afin de maintenir la taille de la population de cellules satellites quiescentes (Yin et al., 2013). Nos travaux ont

permis de mettre en évidence que les étapes de prolifération et d'entrée en différenciation des myoblastes mutants se déroulent de la même manière que dans le cas des myoblastes contrôles, mais que l'absence de Srf est à l'origine d'un défaut de fusion des myoblastes aux fibres au cours de l'hypertrophie compensatoire. Il serait intéressant d'explorer le devenir de ces cellules : restent-elles engagées dans le programme myogénique? Retournent-elles à l'état quiescent ? Sont-elles éliminées par apoptose ?

REFERENCES

- Abadi, A., Glover, E.I., Isfort, R.J., Raha, S., Safdar, A., Yasuda, N., Kaczor, J.J., Melov, S., Hubbard, A., Qu, X., et al. (2009). Limb immobilization induces a coordinate down-regulation of mitochondrial and other metabolic pathways in men and women. *PLoS One* 4, e6518.
- Abruzzo, P.M., di Tullio, S., Marchionni, C., Belia, S., Fanó, G., Zampieri, S., Carraro, U., Kern, H., Sgarbi, G., Lenaz, G., et al. (2010). Oxidative stress in the denervated muscle. *Free Radic. Res.* 44, 563–576.
- Adhihetty, P.J., O’Leary, M.F.N., Chabi, B., Wicks, K.L., and Hood, D.A. (2007). Effect of denervation on mitochondrially mediated apoptosis in skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.* Bethesda Md 102, 1143–1151.
- Affolter, M., Montagne, J., Walldorf, U., Groppe, J., Kloter, U., LaRosa, M., and Gehring, W.J. (1994). The Drosophila SRF homolog is expressed in a subset of tracheal cells and maps within a genomic region required for tracheal development. *Dev. Camb. Engl.* 120, 743–753.
- Alberti, S., Krause, S.M., Kretz, O., Philippar, U., Lemberger, T., Casanova, E., Wiebel, F.F., Schwarz, H., Frotscher, M., Schütz, G., et al. (2005). Neuronal migration in the murine rostral migratory stream requires serum response factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 6148–6153.
- Amthor, H., Macharia, R., Navarrete, R., Schuelke, M., Brown, S.C., Otto, A., Voit, T., Muntoni, F., Vrbóva, G., Partridge, T., et al. (2007). Lack of myostatin results in excessive muscle growth but impaired force generation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 1835–1840.
- Angstenberger, M., Wegener, J.W., Pichler, B.J., Judenhofer, M.S., Feil, S., Alberti, S., Feil, R., and Nordheim, A. (2007). Severe intestinal obstruction on induced smooth muscle-specific ablation of the transcription factor SRF in adult mice. *Gastroenterology* 133, 1948–1959.
- Arai, A., Spencer, J.A., and Olson, E.N. (2002). STARS, a striated muscle activator of Rho signaling and serum response factor-dependent transcription. *J. Biol. Chem.* 277, 24453–24459.
- Arsenian, S., Weinhold, B., Oelgeschläger, M., Rütger, U., and Nordheim, A. (1998). Serum response factor is essential for mesoderm formation during mouse embryogenesis. *EMBO J.* 17, 6289–6299.
- Baarlink, C., Wang, H., and Grosse, R. (2013). Nuclear actin network assembly by formins regulates the SRF coactivator MAL. *Science* 340, 864–867.
- Baehr, L.M., Furlow, J.D., and Bodine, S.C. (2011). Muscle sparing in muscle RING finger 1 null mice: response to synthetic glucocorticoids. *J. Physiol.* 589, 4759–4776.
- Beauchamp, J.R., Heslop, L., Yu, D.S., Tajbakhsh, S., Kelly, R.G., Wernig, A., Buckingham, M.E., Partridge, T.A., and Zammit, P.S. (2000). Expression of CD34 and Myf5 defines the majority of quiescent adult skeletal muscle satellite cells. *J. Cell Biol.* 151, 1221–1234.
- Beck, H., Flynn, K., Lindenberg, K.S., Schwarz, H., Bradke, F., Di Giovanni, S., and Knöll, B. (2012). Serum Response Factor (SRF)-cofilin-actin signaling axis modulates mitochondrial dynamics. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, E2523–2532.

Belaguli, N.S., Schildmeyer, L.A., and Schwartz, R.J. (1997). Organization and Myogenic Restricted Expression of the Murine Serum Response Factor Gene A ROLE FOR AUTOREGULATION. *J. Biol. Chem.* 272, 18222–18231.

Belaguli, N.S., Zhou, W., Trinh, T.H., Majesky, M.W., and Schwartz, R.J. (1999). Dominant negative murine serum response factor: alternative splicing within the activation domain inhibits transactivation of serum response factor binding targets. *Mol. Cell. Biol.* 19, 4582–4591.

Belin, B.J., Cimini, B.A., Blackburn, E.H., and Mullins, R.D. (2013). Visualization of actin filaments and monomers in somatic cell nuclei. *Mol. Biol. Cell* 24, 982–994.

Belyantseva, I.A., Perrin, B.J., Sonnemann, K.J., Zhu, M., Stepanyan, R., McGee, J., Frolenkov, G.I., Walsh, E.J., Friderici, K.H., Friedman, T.B., et al. (2009). Gamma-actin is required for cytoskeletal maintenance but not development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 9703–9708.

Bennett, A.M., and Tonks, N.K. (1997). Regulation of distinct stages of skeletal muscle differentiation by mitogen-activated protein kinases. *Science* 278, 1288–1291.

Bergstrom, D.A., Penn, B.H., Strand, A., Perry, R.L.S., Rudnicki, M.A., and Tapscott, S.J. (2002). Promoter-specific regulation of MyoD binding and signal transduction cooperate to pattern gene expression. *Mol. Cell* 9, 587–600.

Bettinger, B.T., Gilbert, D.M., and Amberg, D.C. (2004). Actin up in the nucleus. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5, 410–415.

Bialek, P., Morris, C., Parkington, J., St Andre, M., Owens, J., Yaworsky, P., Seeherman, H., and Jelinsky, S.A. (2011). Distinct protein degradation profiles are induced by different disuse models of skeletal muscle atrophy. *Physiol. Genomics* 43, 1075–1086.

Bjornson, C.R.R., Cheung, T.H., Liu, L., Tripathi, P.V., Steeper, K.M., and Rando, T.A. (2012). Notch signaling is necessary to maintain quiescence in adult muscle stem cells. *Stem Cells Dayt. Ohio* 30, 232–242.

Blaauw, B., Canato, M., Agatea, L., Toniolo, L., Mammucari, C., Masiero, E., Abraham, R., Sandri, M., Schiaffino, S., and Reggiani, C. (2009). Inducible activation of Akt increases skeletal muscle mass and force without satellite cell activation. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 23, 3896–3905.

Blough, E.R., and Linderman, J.K. (2000). Lack of skeletal muscle hypertrophy in very aged male Fischer 344 x Brown Norway rats. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md* 1985 88, 1265–1270.

Bodine, S.C., Latres, E., Baumhueter, S., Lai, V.K., Nunez, L., Clarke, B.A., Poueymirou, W.T., Panaro, F.J., Na, E., Dharmarajan, K., et al. (2001). Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. *Science* 294, 1704–1708.

Bonaldo, P., and Sandri, M. (2013). Cellular and molecular mechanisms of muscle atrophy. *Dis. Model. Mech.* 6, 25–39.

Brack, A.S., and Rando, T.A. (2012). Tissue-specific stem cells: lessons from the skeletal muscle satellite cell. *Cell Stem Cell* 10, 504–514.

- Bruusgaard, J.C., and Gundersen, K. (2008). In vivo time-lapse microscopy reveals no loss of murine myonuclei during weeks of muscle atrophy. *J. Clin. Invest.* *118*, 1450–1457.
- Bruusgaard, J.C., Johansen, I.B., Egner, I.M., Rana, Z.A., and Gundersen, K. (2010). Myonuclei acquired by overload exercise precede hypertrophy and are not lost on detraining. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *107*, 15111–15116.
- Bruusgaard, J.C., Egner, I.M., Larsen, T.K., Dupre-Aucouturier, S., Desplanches, D., and Gundersen, K. (2012). No change in myonuclear number during muscle unloading and reloading. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md 1985* *113*, 290–296.
- Buchwalter, G., Gross, C., and Wasylyk, B. (2004). Ets ternary complex transcription factors. *Gene* *324*, 1–14.
- Buchwalter, G., Gross, C., and Wasylyk, B. (2005). The ternary complex factor Net regulates cell migration through inhibition of PAI-1 expression. *Mol. Cell. Biol.* *25*, 10853–10862.
- Buckingham, M. (2006). Myogenic progenitor cells and skeletal myogenesis in vertebrates. *Curr. Opin. Genet. Dev.* *16*, 525–532.
- Buckingham, M., and Relaix, F. (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*, 645–673.
- Buckingham, M., Bajard, L., Chang, T., Daubas, P., Hadchouel, J., Meilhac, S., Montarras, D., Rocancourt, D., and Relaix, F. (2003). The formation of skeletal muscle: from somite to limb. *J. Anat.* *202*, 59–68.
- Burkin, D.J., and Kaufman, S.J. (1999). The alpha7beta1 integrin in muscle development and disease. *Cell Tissue Res.* *296*, 183–190.
- Busche, S., Descot, A., Julien, S., Genth, H., and Posern, G. (2008). Epithelial cell-cell contacts regulate SRF-mediated transcription via Rac-actin-MAL signalling. *J. Cell Sci.* *121*, 1025–1035.
- Cai, D., Frantz, J.D., Tawa, N.E., Jr, Melendez, P.A., Oh, B.-C., Lidov, H.G.W., Hasselgren, P.-O., Frontera, W.R., Lee, J., Glass, D.J., et al. (2004). IKKbeta/NF-kappaB activation causes severe muscle wasting in mice. *Cell* *119*, 285–298.
- Carnac, G., Primig, M., Kitzmann, M., Chafey, P., Tuil, D., Lamb, N., and Fernandez, A. (1998). RhoA GTPase and serum response factor control selectively the expression of MyoD without affecting Myf5 in mouse myoblasts. *Mol. Biol. Cell* *9*, 1891–1902.
- Caron, A.Z., Drouin, G., Desrosiers, J., Trensz, F., and Grenier, G. (2009). A novel hindlimb immobilization procedure for studying skeletal muscle atrophy and recovery in mouse. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md 1985* *106*, 2049–2059.
- Carson, J.A., and Booth, F.W. (1999). Serum response factor mRNA induction in the hypertrophying chicken patagialis muscle. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md 1985* *86*, 377–382.

Carson, J.A., Yamaguchi, M., and Alway, S.E. (1995). Hypertrophy and proliferation of skeletal muscle fibers from aged quail. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md* 1985 78, 293–299.

Cen, B., Selvaraj, A., Burgess, R.C., Hitzler, J.K., Ma, Z., Morris, S.W., and Prywes, R. (2003). Megakaryoblastic leukemia 1, a potent transcriptional coactivator for serum response factor (SRF), is required for serum induction of SRF target genes. *Mol. Cell. Biol.* 23, 6597–6608.

Cesari, F., Brecht, S., Vintersten, K., Vuong, L.G., Hofmann, M., Klingel, K., Schnorr, J.-J., Arsenian, S., Schild, H., Herdegen, T., et al. (2004). Mice deficient for the ets transcription factor elk-1 show normal immune responses and mildly impaired neuronal gene activation. *Mol. Cell. Biol.* 24, 294–305.

Chai, J., and Tarnawski, A.S. (2002). Serum response factor: discovery, biochemistry, biological roles and implications for tissue injury healing. *J. Physiol. Pharmacol. Off. J. Pol. Physiol. Soc.* 53, 147–157.

Charbonney, E., Speight, P., Masszi, A., Nakano, H., and Kapus, A. (2011). β -catenin and Smad3 regulate the activity and stability of myocardin-related transcription factor during epithelial-myofibroblast transition. *Mol. Biol. Cell* 22, 4472–4485.

Charvet, C., Houbron, C., Parlakian, A., Giordani, J., Lahoute, C., Bertrand, A., Sotiropoulos, A., Renou, L., Schmitt, A., Melki, J., et al. (2006). New role for serum response factor in postnatal skeletal muscle growth and regeneration via the interleukin 4 and insulin-like growth factor 1 pathways. *Mol. Cell. Biol.* 26, 6664–6674.

Chen, J.-F., Mandel, E.M., Thomson, J.M., Wu, Q., Callis, T.E., Hammond, S.M., Conlon, F.L., and Wang, D.-Z. (2006). The role of microRNA-1 and microRNA-133 in skeletal muscle proliferation and differentiation. *Nat. Genet.* 38, 228–233.

Chowdhury, P., Soulsby, M.E., and Scott, J.L. (2009). Effects of aminoguanidine on tissue oxidative stress induced by hindlimb unloading in rats. *Ann. Clin. Lab. Sci.* 39, 64–70.

Civitaresse, A.E., Carling, S., Heilbronn, L.K., Hulver, M.H., Ukropcova, B., Deutsch, W.A., Smith, S.R., Ravussin, E., and CALERIE Pennington Team (2007). Calorie restriction increases muscle mitochondrial biogenesis in healthy humans. *PLoS Med.* 4, e76.

Clarke, B.A., Drujan, D., Willis, M.S., Murphy, L.O., Corpina, R.A., Burova, E., Rakhilin, S.V., Stitt, T.N., Patterson, C., Latres, E., et al. (2007). The E3 Ligase MuRF1 degrades myosin heavy chain protein in dexamethasone-treated skeletal muscle. *Cell Metab.* 6, 376–385.

Codogno, P. (2004). [ATG genes and macroautophagy]. *Médecine Sci. MS* 20, 734–736.

Cohen, S., Brault, J.J., Gygi, S.P., Glass, D.J., Valenzuela, D.M., Gartner, C., Latres, E., and Goldberg, A.L. (2009). During muscle atrophy, thick, but not thin, filament components are degraded by MuRF1-dependent ubiquitylation. *J. Cell Biol.* 185, 1083–1095.

Cohen, S., Zhai, B., Gygi, S.P., and Goldberg, A.L. (2012). Ubiquitylation by Trim32 causes coupled loss of desmin, Z-bands, and thin filaments in muscle atrophy. *J. Cell Biol.* *198*, 575–589.

Cong, H., Sun, L., Liu, C., and Tien, P. (2011). Inhibition of atrogin-1/MAFbx expression by adenovirus-delivered small hairpin RNAs attenuates muscle atrophy in fasting mice. *Hum. Gene Ther.* *22*, 313–324.

Cornelison, D.D., and Wold, B.J. (1997). Single-cell analysis of regulatory gene expression in quiescent and activated mouse skeletal muscle satellite cells. *Dev. Biol.* *191*, 270–283.

Cornelison, D.D., Filla, M.S., Stanley, H.M., Rapraeger, A.C., and Olwin, B.B. (2001). Syndecan-3 and syndecan-4 specifically mark skeletal muscle satellite cells and are implicated in satellite cell maintenance and muscle regeneration. *Dev. Biol.* *239*, 79–94.

Cornelison, D.D.W., Wilcox-Adelman, S.A., Goetinck, P.F., Rauvala, H., Rapraeger, A.C., and Olwin, B.B. (2004). Essential and separable roles for Syndecan-3 and Syndecan-4 in skeletal muscle development and regeneration. *Genes Dev.* *18*, 2231–2236.

Cossu, G., and Biressi, S. (2005). Satellite cells, myoblasts and other occasional myogenic progenitors: possible origin, phenotypic features and role in muscle regeneration. *Semin. Cell Dev. Biol.* *16*, 623–631.

Cossu, G., and Tajbakhsh, S. (2007). Oriented cell divisions and muscle satellite cell heterogeneity. *Cell* *129*, 859–861.

Costello, P.S., Nicolas, R.H., Watanabe, Y., Rosewell, I., and Treisman, R. (2004). Ternary complex factor SAP-1 is required for Erk-mediated thymocyte positive selection. *Nat. Immunol.* *5*, 289–298.

Creemers, E.E., Sutherland, L.B., Oh, J., Barbosa, A.C., and Olson, E.N. (2006). Coactivation of MEF2 by the SAP domain proteins myocardin and MASTR. *Mol. Cell* *23*, 83–96.

Crescenzi, M., Fleming, T.P., Lassar, A.B., Weintraub, H., and Aaronson, S.A. (1990). MyoD induces growth arrest independent of differentiation in normal and transformed cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *87*, 8442–8446.

Dalton, S., and Treisman, R. (1992). Characterization of SAP-1, a protein recruited by serum response factor to the c-fos serum response element. *Cell* *68*, 597–612.

Daston, G., Lamar, E., Olivier, M., and Goulding, M. (1996). Pax-3 is necessary for migration but not differentiation of limb muscle precursors in the mouse. *Dev. Camb. Engl.* *122*, 1017–1027.

Dedkov, E.I., Borisov, A.B., Wernig, A., and Carlson, B.M. (2003). Aging of skeletal muscle does not affect the response of satellite cells to denervation. *J. Histochem. Cytochem. Off. J. Histochem. Soc.* *51*, 853–863.

Dellavalle, A., Maroli, G., Covarello, D., Azzoni, E., Innocenzi, A., Perani, L., Antonini, S., Sambasivan, R., Brunelli, S., Tajbakhsh, S., et al. (2011). Pericytes resident in postnatal skeletal muscle differentiate into muscle fibres and generate satellite cells. *Nat. Commun.* *2*, 499.

- Dice, J.F. (2007). Chaperone-mediated autophagy. *Autophagy* 3, 295–299.
- Dopie, J., Skarp, K.-P., Rajakylä, E.K., Tanhuanpää, K., and Vartiainen, M.K. (2012). Active maintenance of nuclear actin by importin 9 supports transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, E544–552.
- Drewett, V., Devitt, A., Saxton, J., Portman, N., Greaney, P., Cheong, N.E., Alnemri, T.F., Alnemri, E., and Shaw, P.E. (2001). Serum response factor cleavage by caspases 3 and 7 linked to apoptosis in human BJAB cells. *J. Biol. Chem.* 276, 33444–33451.
- Du, J., Wang, X., Miereles, C., Bailey, J.L., Debigare, R., Zheng, B., Price, S.R., and Mitch, W.E. (2004). Activation of caspase-3 is an initial step triggering accelerated muscle proteolysis in catabolic conditions. *J. Clin. Invest.* 113, 115–123.
- Durieux, A.-C., Amirouche, A., Banzet, S., Koulmann, N., Bonnefoy, R., Padeloup, M., Mouret, C., Bigard, X., Peinnequin, A., and Freyssenet, D. (2007). Ectopic expression of myostatin induces atrophy of adult skeletal muscle by decreasing muscle gene expression. *Endocrinology* 148, 3140–3147.
- Esner, M., Meilhac, S.M., Relaix, F., Nicolas, J.-F., Cossu, G., and Buckingham, M.E. (2006). Smooth muscle of the dorsal aorta shares a common clonal origin with skeletal muscle of the myotome. *Dev. Camb. Engl.* 133, 737–749.
- Etkin, A., Alarcón, J.M., Weisberg, S.P., Touzani, K., Huang, Y.Y., Nordheim, A., and Kandel, E.R. (2006). A role in learning for SRF: deletion in the adult forebrain disrupts LTD and the formation of an immediate memory of a novel context. *Neuron* 50, 127–143.
- Evelyn, C.R., Wade, S.M., Wang, Q., Wu, M., Iñiguez-Lluhí, J.A., Merajver, S.D., and Neubig, R.R. (2007). CCG-1423: a small-molecule inhibitor of RhoA transcriptional signaling. *Mol. Cancer Ther.* 6, 2249–2260.
- Fiatarone, M.A., O'Neill, E.F., Ryan, N.D., Clements, K.M., Solares, G.R., Nelson, M.E., Roberts, S.B., Kehayias, J.J., Lipsitz, L.A., and Evans, W.J. (1994). Exercise Training and Nutritional Supplementation for Physical Frailty in Very Elderly People. *N. Engl. J. Med.* 330, 1769–1775.
- Fleige, A., Alberti, S., Gröbe, L., Frischmann, U., Geffers, R., Müller, W., Nordheim, A., and Schippers, A. (2007). Serum response factor contributes selectively to lymphocyte development. *J. Biol. Chem.* 282, 24320–24328.
- Flück, M., Carson, J.A., Schwartz, R.J., and Booth, F.W. (1999). SRF protein is upregulated during stretch-induced hypertrophy of rooster ALD muscle. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md* 1985 86, 1793–1799.
- Franco, C.A., Mericskay, M., Parlakian, A., Gary-Bobo, G., Gao-Li, J., Paulin, D., Gustafsson, E., and Li, Z. (2008). Serum response factor is required for sprouting angiogenesis and vascular integrity. *Dev. Cell* 15, 448–461.
- Galmiche, G., Labat, C., Mericskay, M., Aissa, K.A., Blanc, J., Retailleau, K., Bourhim, M., Coletti, D., Loufrani, L., Gao-Li, J., et al. (2013). Inactivation of serum response factor contributes to decrease vascular muscular tone and arterial stiffness in mice. *Circ. Res.* 112, 1035–1045.

- Gauthier-Rouviere, C., Vandromme, M., Tuil, D., Lautredou, N., Morris, M., Soulez, M., Kahn, A., Fernandez, A., and Lamb, N. (1996). Expression and activity of serum response factor is required for expression of the muscle-determining factor MyoD in both dividing and differentiating mouse C2C12 myoblasts. *Mol. Biol. Cell* 7, 719–729.
- Geneste, O., Copeland, J.W., and Treisman, R. (2002). LIM kinase and Diaphanous cooperate to regulate serum response factor and actin dynamics. *J. Cell Biol.* 157, 831–838.
- Gieni, R.S., and Hendzel, M.J. (2009). Actin dynamics and functions in the interphase nucleus: moving toward an understanding of nuclear polymeric actin. *Biochem. Cell Biol. Biochim. Biol. Cell.* 87, 283–306.
- Giger, J.M., Bodell, P.W., Zeng, M., Baldwin, K.M., and Haddad, F. (2009). Rapid muscle atrophy response to unloading: pretranslational processes involving MHC and actin. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md* 107, 1204–1212.
- Giovane, A., Pintzas, A., Maira, S.M., Sobieszczuk, P., and Wasyluk, B. (1994). Net, a new ets transcription factor that is activated by Ras. *Genes Dev.* 8, 1502–1513.
- Gnocchi, V.F., White, R.B., Ono, Y., Ellis, J.A., and Zammit, P.S. (2009). Further characterisation of the molecular signature of quiescent and activated mouse muscle satellite cells. *PLoS One* 4, e5205.
- Gokhin, D.S., and Fowler, V.M. (2011). Cytoplasmic gamma-actin and tropomodulin isoforms link to the sarcoplasmic reticulum in skeletal muscle fibers. *J. Cell Biol.* 194, 105–120.
- Gomes, M.D., Lecker, S.H., Jagoe, R.T., Navon, A., and Goldberg, A.L. (2001). Atrogin-1, a muscle-specific F-box protein highly expressed during muscle atrophy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 14440–14445.
- Goulding, M., Lumsden, A., and Paquette, A.J. (1994). Regulation of Pax-3 expression in the dermomyotome and its role in muscle development. *Dev. Camb. Engl.* 120, 957–971.
- Le Grand, F., and Rudnicki, M.A. (2007). Skeletal muscle satellite cells and adult myogenesis. *Curr. Opin. Cell Biol.* 19, 628–633.
- Le Grand, F., Jones, A.E., Seale, V., Scimè, A., and Rudnicki, M.A. (2009). Wnt7a activates the planar cell polarity pathway to drive the symmetric expansion of satellite stem cells. *Cell Stem Cell* 4, 535–547.
- Gros, J., Manceau, M., Thomé, V., and Marcelle, C. (2005). A common somitic origin for embryonic muscle progenitors and satellite cells. *Nature* 435, 954–958.
- Guerci, A., Lahoute, C., Hébrard, S., Collard, L., Graindorge, D., Favier, M., Cagnard, N., Batonnet-Pichon, S., Précigout, G., Garcia, L., et al. (2012). Srf-Dependent Paracrine Signals Produced by Myofibers Control Satellite Cell-Mediated Skeletal Muscle Hypertrophy. *Cell Metab.* 15, 25–37.
- Guettler, S., Vartiainen, M.K., Miralles, F., Larijani, B., and Treisman, R. (2008). RPEL motifs link the serum response factor cofactor MAL but not myocardin to Rho signaling via actin binding. *Mol. Cell. Biol.* 28, 732–742.

Günther, S., and Kruse, K. (2007). Spontaneous waves in muscle fibres. *New J. Phys.* **9**, 417.

Gustafsson, A.B. (2011). Bnip3 as a dual regulator of mitochondrial turnover and cell death in the myocardium. *Pediatr. Cardiol.* **32**, 267–274.

Halene, S., Gao, Y., Hahn, K., Massaro, S., Italiano, J.E., Jr, Schulz, V., Lin, S., Kupfer, G.M., and Krause, D.S. (2010). Serum response factor is an essential transcription factor in megakaryocytic maturation. *Blood* **116**, 1942–1950.

Halevy, O., Novitch, B.G., Spicer, D.B., Skapek, S.X., Rhee, J., Hannon, G.J., Beach, D., and Lassar, A.B. (1995). Correlation of terminal cell cycle arrest of skeletal muscle with induction of p21 by MyoD. *Science* **267**, 1018–1021.

Hanaoka, B.Y., Peterson, C.A., Horbinski, C., and Crofford, L.J. (2012). Implications of glucocorticoid therapy in idiopathic inflammatory myopathies. *Nat. Rev. Rheumatol.* **8**, 448–457.

Herndon, C.A., Ankenbruck, N., Lester, B., Bailey, J., and Fromm, L. (2013). Neuregulin1 signaling targets SRF and CREB and activates the muscle spindle-specific gene *Egr3* through a composite SRF–CREB-binding site. *Exp. Cell Res.* **319**, 718–730.

Hill, C.S., Wynne, J., and Treisman, R. (1995). The Rho family GTPases RhoA, Rac1, and CDC42Hs regulate transcriptional activation by SRF. *Cell* **81**, 1159–1170.

Hirano, H., and Matsuura, Y. (2011). Sensing actin dynamics: structural basis for G-actin-sensitive nuclear import of MAL. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **414**, 373–378.

Hofmann, W.A., Stojiljkovic, L., Fuchsova, B., Vargas, G.M., Mavrommatis, E., Philimonenko, V., Kysela, K., Goodrich, J.A., Lessard, J.L., Hope, T.J., et al. (2004). Actin is part of pre-initiation complexes and is necessary for transcription by RNA polymerase II. *Nat. Cell Biol.* **6**, 1094–1101.

Holtz, M.L., and Misra, R.P. (2008). Endothelial-specific ablation of serum response factor causes hemorrhaging, yolk sac vascular failure, and embryonic lethality. *BMC Dev. Biol.* **8**, 65.

Hu, P., Wu, S., and Hernandez, N. (2004). A role for beta-actin in RNA polymerase III transcription. *Genes Dev.* **18**, 3010–3015.

Hudson, M.B., and Price, S.R. (2013). Calcineurin: A poorly understood regulator of muscle mass. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*

Huveneers, S., and Danen, E.H.J. (2009). Adhesion signaling - crosstalk between integrins, Src and Rho. *J. Cell Sci.* **122**, 1059–1069.

Hynes, R.O. (2002). Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* **110**, 673–687.

Iqbal, S., Ostojic, O., Singh, K., Joseph, A.-M., and Hood, D.A. (2013). Expression of mitochondrial fission and fusion regulatory proteins in skeletal muscle during chronic use and disuse. *Muscle Nerve*.

- Irintchev, A., Zeschnigk, M., Starzinski-Powitz, A., and Wernig, A. (1994). Expression pattern of M-cadherin in normal, denervated, and regenerating mouse muscles. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* *199*, 326–337.
- Iyer, D., Belaguli, N., Flück, M., Rowan, B.G., Wei, L., Weigel, N.L., Booth, F.W., Epstein, H.F., Schwartz, R.J., and Balasubramanyam, A. (2003). Novel phosphorylation target in the serum response factor MADS box regulates alpha-actin transcription. *Biochemistry (Mosc.)* *42*, 7477–7486.
- Iyer, D., Chang, D., Marx, J., Wei, L., Olson, E.N., Parmacek, M.S., Balasubramanyam, A., and Schwartz, R.J. (2006). Serum response factor MADS box serine-162 phosphorylation switches proliferation and myogenic gene programs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *103*, 4516–4521.
- Jin, W., Goldfine, A.B., Boes, T., Henry, R.R., Ciaraldi, T.P., Kim, E.-Y., Emecan, M., Fitzpatrick, C., Sen, A., Shah, A., et al. (2011). Increased SRF transcriptional activity in human and mouse skeletal muscle is a signature of insulin resistance. *J. Clin. Invest.* *121*, 918–929.
- Johansen, F.E., and Prywes, R. (1993). Identification of transcriptional activation and inhibitory domains in serum response factor (SRF) by using GAL4-SRF constructs. *Mol. Cell. Biol.* *13*, 4640–4647.
- Jostes, B., Walther, C., and Gruss, P. (1990). The murine paired box gene, Pax7, is expressed specifically during the development of the nervous and muscular system. *Mech. Dev.* *33*, 27–37.
- Ju, J.-S., Varadhachary, A.S., Miller, S.E., and Wehl, C.C. (2010). Quantitation of “autophagic flux” in mature skeletal muscle. *Autophagy* *6*, 929–935.
- Kadi, F., Charifi, N., Denis, C., Lexell, J., Andersen, J.L., Schjerling, P., Olsen, S., and Kjaer, M. (2005). The behaviour of satellite cells in response to exercise: what have we learned from human studies? *Pflügers Arch. Eur. J. Physiol.* *451*, 319–327.
- Kaplan-Albuquerque, N., Van Putten, V., Weiser-Evans, M.C., and Nemenoff, R.A. (2005). Depletion of serum response factor by RNA interference mimics the mitogenic effects of platelet derived growth factor-BB in vascular smooth muscle cells. *Circ. Res.* *97*, 427–433.
- Kavazis, A.N., Talbert, E.E., Smuder, A.J., Hudson, M.B., Nelson, W.B., and Powers, S.K. (2009). Mechanical ventilation induces diaphragmatic mitochondrial dysfunction and increased oxidant production. *Free Radic. Biol. Med.* *46*, 842–850.
- Kemp, P.R., and Metcalfe, J.C. (2000). Four isoforms of serum response factor that increase or inhibit smooth-muscle-specific promoter activity. *Biochem. J.* *345 Pt 3*, 445–451.
- Khorchid, A., and Ikura, M. (2002). How calpain is activated by calcium. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *9*, 239–241.
- Kimura, S., Noda, T., and Yoshimori, T. (2007). Dissection of the autophagosome maturation process by a novel reporter protein, tandem fluorescent-tagged LC3. *Autophagy* *3*, 452–460.

Kitamoto, T., and Hanaoka, K. (2010). Notch3 null mutation in mice causes muscle hyperplasia by repetitive muscle regeneration. *Stem Cells Dayt. Ohio* 28, 2205–2216.

Koegel, H., von Tobel, L., Schäfer, M., Alberti, S., Kremmer, E., Mauch, C., Hohl, D., Wang, X.-J., Beer, H.-D., Bloch, W., et al. (2009). Loss of serum response factor in keratinocytes results in hyperproliferative skin disease in mice. *J. Clin. Invest.* 119, 899–910.

Kondo, H., Miura, M., and Itokawa, Y. (1991). Oxidative stress in skeletal muscle atrophied by immobilization. *Acta Physiol. Scand.* 142, 527–528.

Kubli, D.A., Ycaza, J.E., and Gustafsson, A.B. (2007). Bnip3 mediates mitochondrial dysfunction and cell death through Bax and Bak. *Biochem. J.* 405, 407–415.

Kuwahara, K., Barrientos, T., Pipes, G.C.T., Li, S., and Olson, E.N. (2005). Muscle-specific signaling mechanism that links actin dynamics to serum response factor. *Mol. Cell. Biol.* 25, 3173–3181.

Kuwahara, K., Kinoshita, H., Kuwabara, Y., Nakagawa, Y., Usami, S., Minami, T., Yamada, Y., Fujiwara, M., and Nakao, K. (2010). Myocardin-related transcription factor A is a common mediator of mechanical stress- and neurohumoral stimulation-induced cardiac hypertrophic signaling leading to activation of brain natriuretic peptide gene expression. *Mol. Cell. Biol.* 30, 4134–4148.

L'honore, A., Lamb, N.J., Vandromme, M., Turowski, P., Carnac, G., and Fernandez, A. (2003). MyoD distal regulatory region contains an SRF binding CArG element required for MyoD expression in skeletal myoblasts and during muscle regeneration. *Mol. Biol. Cell* 14, 2151–2162.

L'honore, A., Rana, V., Arsic, N., Franckhauser, C., Lamb, N.J., and Fernandez, A. (2007). Identification of a new hybrid serum response factor and myocyte enhancer factor 2-binding element in MyoD enhancer required for MyoD expression during myogenesis. *Mol. Biol. Cell* 18, 1992–2001.

Lagirand-Cantaloube, J., Offner, N., Csibi, A., Leibovitch, M.P., Batonnet-Pichon, S., Tintignac, L.A., Segura, C.T., and Leibovitch, S.A. (2008). The initiation factor eIF3-f is a major target for atrogen1/MAFbx function in skeletal muscle atrophy. *EMBO J.* 27, 1266–1276.

Lahoute, C., Sotiropoulos, A., Favier, M., Guillet-Deniau, I., Charvet, C., Ferry, A., Butler-Browne, G., Metzger, D., Tuil, D., and Daegelen, D. (2008). Premature aging in skeletal muscle lacking serum response factor. *PLoS One* 3, e3910.

Lai, K.-M.V., Gonzalez, M., Poueymirou, W.T., Kline, W.O., Na, E., Zlotchenko, E., Stitt, T.N., Economides, A.N., Yancopoulos, G.D., and Glass, D.J. (2004). Conditional activation of akt in adult skeletal muscle induces rapid hypertrophy. *Mol. Cell. Biol.* 24, 9295–9304.

Lamark, T., Kirkin, V., Dikic, I., and Johansen, T. (2009a). NBR1 and p62 as cargo receptors for selective autophagy of ubiquitinated targets. *Cell Cycle Georget. Tex* 8, 1986–1990.

Lamark, T., Kirkin, V., Dikic, I., and Johansen, T. (2009b). NBR1 and p62 as cargo receptors for selective autophagy of ubiquitinated targets. *Cell Cycle Georget. Tex* 8, 1986–1990.

Lamon, S., Wallace, M.A., Léger, B., and Russell, A.P. (2009). Regulation of STARS and its downstream targets suggest a novel pathway involved in human skeletal muscle hypertrophy and atrophy. *J. Physiol.* *587*, 1795–1803.

Lange, S., Xiang, F., Yakovenko, A., Vihola, A., Hackman, P., Rostkova, E., Kristensen, J., Brandmeier, B., Franzen, G., Hedberg, B., et al. (2005). The kinase domain of titin controls muscle gene expression and protein turnover. *Science* *308*, 1599–1603.

Lecker, S.H., Jagoe, R.T., Gilbert, A., Gomes, M., Baracos, V., Bailey, J., Price, S.R., Mitch, W.E., and Goldberg, A.L. (2004). Multiple types of skeletal muscle atrophy involve a common program of changes in gene expression. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *18*, 39–51.

Lepper, C., Partridge, T.A., and Fan, C.-M. (2011). An absolute requirement for Pax7-positive satellite cells in acute injury-induced skeletal muscle regeneration. *Dev. Camb. Engl.* *138*, 3639–3646.

Li, J., Zhu, X., Chen, M., Cheng, L., Zhou, D., Lu, M.M., Du, K., Epstein, J.A., and Parmacek, M.S. (2005a). Myocardin-related transcription factor B is required in cardiac neural crest for smooth muscle differentiation and cardiovascular development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 8916–8921.

Li, S., Wang, D.-Z., Wang, Z., Richardson, J.A., and Olson, E.N. (2003a). The serum response factor coactivator myocardin is required for vascular smooth muscle development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 9366–9370.

Li, S., Czubryt, M.P., McAnally, J., Bassel-Duby, R., Richardson, J.A., Wiebel, F.F., Nordheim, A., and Olson, E.N. (2005b). Requirement for serum response factor for skeletal muscle growth and maturation revealed by tissue-specific gene deletion in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 1082–1087.

Li, S., Chang, S., Qi, X., Richardson, J.A., and Olson, E.N. (2006). Requirement of a myocardin-related transcription factor for development of mammary myoepithelial cells. *Mol. Cell. Biol.* *26*, 5797–5808.

Li, Y.-P., Lecker, S.H., Chen, Y., Waddell, I.D., Goldberg, A.L., and Reid, M.B. (2003b). TNF-alpha increases ubiquitin-conjugating activity in skeletal muscle by up-regulating UbCH2/E220k. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *17*, 1048–1057.

Li, Y.-P., Chen, Y., Li, A.S., and Reid, M.B. (2003c). Hydrogen peroxide stimulates ubiquitin-conjugating activity and expression of genes for specific E2 and E3 proteins in skeletal muscle myotubes. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* *285*, C806–812.

Lluís, F., Ballestar, E., Suelves, M., Esteller, M., and Muñoz-Cánoves, P. (2005). E47 phosphorylation by p38 MAPK promotes MyoD/E47 association and muscle-specific gene transcription. *EMBO J.* *24*, 974–984.

Lokireddy, S., Wijesoma, I.W., Teng, S., Bonala, S., Gluckman, P.D., McFarlane, C., Sharma, M., and Kambadur, R. (2012). The ubiquitin ligase Mu11 induces mitophagy in skeletal muscle in response to muscle-wasting stimuli. *Cell Metab.* *16*, 613–624.

López-Lluch, G., Hunt, N., Jones, B., Zhu, M., Jamieson, H., Hilmer, S., Cascajo, M.V., Allard, J., Ingram, D.K., Navas, P., et al. (2006). Calorie restriction induces

mitochondrial biogenesis and bioenergetic efficiency. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *103*, 1768–1773.

Lubic, S.P., Giacomini, K.M., and Giacomini, J.C. (1995). The effects of modulation of calcium influx through the voltage-sensitive calcium channel on cardiomyocyte hypertrophy. *J. Mol. Cell. Cardiol.* *27*, 917–925.

Maas, H., Jaspers, R.T., Baan, G.C., and Huijing, P.A. (2003). Myofascial force transmission between a single muscle head and adjacent tissues: length effects of head III of rat EDL. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md 1985 95*, 2004–2013.

Madaro, L., Marrocco, V., Fiore, P., Aulino, P., Smeriglio, P., Adamo, S., Molinaro, M., and Bouché, M. (2011). PKC θ signaling is required for myoblast fusion by regulating the expression of caveolin-3 and β 1D integrin upstream focal adhesion kinase. *Mol. Biol. Cell* *22*, 1409–1419.

Mammucari, C., Schiaffino, S., and Sandri, M. (2008). Downstream of Akt: FoxO3 and mTOR in the regulation of autophagy in skeletal muscle. *Autophagy* *4*, 524–526.

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

McCarthy, J.J., Mula, J., Miyazaki, M., Erfani, R., Garrison, K., Farooqui, A.B., Srikuea, R., Lawson, B.A., Grimes, B., Keller, C., et al. (2011). Effective fiber hypertrophy in satellite cell-depleted skeletal muscle. *Dev. Camb. Engl.* *138*, 3657–3666.

McDonald, D., Carrero, G., Andrin, C., de Vries, G., and Hendzel, M.J. (2006). Nucleoplasmic beta-actin exists in a dynamic equilibrium between low-mobility polymeric species and rapidly diffusing populations. *J. Cell Biol.* *172*, 541–552.

McFarlane, C., Plummer, E., Thomas, M., Hennebry, A., Ashby, M., Ling, N., Smith, H., Sharma, M., and Kambadur, R. (2006). Myostatin induces cachexia by activating the ubiquitin proteolytic system through an NF-kappaB-independent, FoxO1-dependent mechanism. *J. Cell. Physiol.* *209*, 501–514.

McGee, K.M., Vartiainen, M.K., Khaw, P.T., Treisman, R., and Bailly, M. (2011). Nuclear transport of the serum response factor coactivator MRTF-A is downregulated at tensional homeostasis. *EMBO Rep.* *12*, 963–970.

McPherron, A.C., Lawler, A.M., and Lee, S.J. (1997). Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member. *Nature* *387*, 83–90.

Van der Meer, S.F.T., Jaspers, R.T., Jones, D.A., and Degens, H. (2011). Time-course of changes in the myonuclear domain during denervation in young-adult and old rat gastrocnemius muscle. *Muscle Nerve* *43*, 212–222.

Mendez, M.G., and Janmey, P.A. (2012). Transcription factor regulation by mechanical stress. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *44*, 728–732.

Mericskay, M., Blanc, J., Tritsch, E., Moriez, R., Aubert, P., Neunlist, M., Feil, R., and Li, Z. (2007). Inducible mouse model of chronic intestinal pseudo-obstruction by smooth muscle-specific inactivation of the SRF gene. *Gastroenterology* *133*, 1960–1970.

Miano, J.M. (2010). Role of serum response factor in the pathogenesis of disease. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* 90, 1274–1284.

Miano, J.M., Ramanan, N., Georger, M.A., de Mesy Bentley, K.L., Emerson, R.L., Balza, R.O., Jr, Xiao, Q., Weiler, H., Ginty, D.D., and Misra, R.P. (2004). Restricted inactivation of serum response factor to the cardiovascular system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 17132–17137.

Miano, J.M., Long, X., and Fujiwara, K. (2007a). Serum response factor: master regulator of the actin cytoskeleton and contractile apparatus. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 292, C70–81.

Miano, J.M., Long, X., and Fujiwara, K. (2007b). Serum response factor: master regulator of the actin cytoskeleton and contractile apparatus. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 292, C70–81.

Min, K., Smuder, A.J., Kwon, O.-S., Kavazis, A.N., Szeto, H.H., and Powers, S.K. (2011). Mitochondrial-targeted antioxidants protect skeletal muscle against immobilization-induced muscle atrophy. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md* 1985 111, 1459–1466.

Minami, T., Kuwahara, K., Nakagawa, Y., Takaoka, M., Kinoshita, H., Nakao, K., Kuwabara, Y., Yamada, Y., Yamada, C., Shibata, J., et al. (2012). Reciprocal expression of MRTF-A and myocardin is crucial for pathological vascular remodelling in mice. *EMBO J.* 31, 4428–4440.

Miniou, P., Tiziano, D., Frugier, T., Roblot, N., Le Meur, M., and Melki, J. (1999). Gene targeting restricted to mouse striated muscle lineage. *Nucleic Acids Res.* 27, e27.

Minty, A., and Kedes, L. (1986). Upstream regions of the human cardiac actin gene that modulate its transcription in muscle cells: presence of an evolutionarily conserved repeated motif. *Mol. Cell. Biol.* 6, 2125–2136.

Miralles, F., Posern, G., Zaromytidou, A.-I., and Treisman, R. (2003). Actin dynamics control SRF activity by regulation of its coactivator MAL. *Cell* 113, 329–342.

Miralles, F., Hébrard, S., Lamotte, L., Durel, B., Gilgenkrantz, H., Li, Z., Daegelen, D., Tuil, D., and Joshi, R.L. (2006). Conditional inactivation of the murine serum response factor in the pancreas leads to severe pancreatitis. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* 86, 1020–1036.

Mittal, A., Bhatnagar, S., Kumar, A., Lach-Trifilieff, E., Wauters, S., Li, H., Makonchuk, D.Y., Glass, D.J., and Kumar, A. (2010). The TWEAK-Fn14 system is a critical regulator of denervation-induced skeletal muscle atrophy in mice. *J. Cell Biol.* 188, 833–849.

Mizushima, N., and Yoshimori, T. (2007). How to interpret LC3 immunoblotting. *Autophagy* 3, 542–545.

Mizushima, N., Levine, B., Cuervo, A.M., and Klionsky, D.J. (2008). Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature* 451, 1069–1075.

Modak, C., and Chai, J. (2010). Serum response factor: look into the gut. *World J. Gastroenterol. WJG* 16, 2195–2201.

Montarras, D., L'honoré, A., and Buckingham, M. (2013). Lying low but ready for action: the quiescent muscle satellite cell. *FEBS J.* *280*, 4036–4050.

Mourikis, P., Sambasivan, R., Castel, D., Rocheteau, P., Bizzarro, V., and Tajbakhsh, S. (2012). A critical requirement for notch signaling in maintenance of the quiescent skeletal muscle stem cell state. *Stem Cells Dayt. Ohio* *30*, 243–252.

Muller, F.L., Song, W., Jang, Y.C., Liu, Y., Sabia, M., Richardson, A., and Van Remmen, H. (2007). Denervation-induced skeletal muscle atrophy is associated with increased mitochondrial ROS production. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* *293*, R1159–1168.

Murphy, M.M., Lawson, J.A., Mathew, S.J., Hutcheson, D.A., and Kardon, G. (2011). Satellite cells, connective tissue fibroblasts and their interactions are crucial for muscle regeneration. *Dev. Camb. Engl.* *138*, 3625–3637.

Nisoli, E., Tonello, C., Cardile, A., Cozzi, V., Bracale, R., Tedesco, L., Falcone, S., Valerio, A., Cantoni, O., Clementi, E., et al. (2005). Calorie restriction promotes mitochondrial biogenesis by inducing the expression of eNOS. *Science* *310*, 314–317.

O'Connor, R.S., and Pavlath, G.K. (2007). Point:Counterpoint: Satellite cell addition is/is not obligatory for skeletal muscle hypertrophy. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md* *1985* *103*, 1099–1100.

O'Connor, R.S., Pavlath, G.K., McCarthy, J.J., and Esser, K.A. (2007). Last Word on Point:Counterpoint: Satellite cell addition is/is not obligatory for skeletal muscle hypertrophy. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md* *1985* *103*, 1107.

Ochala, J., Gustafson, A.-M., Diez, M.L., Renaud, G., Li, M., Aare, S., Qaisar, R., Banduseela, V.C., Hedström, Y., Tang, X., et al. (2011). Preferential skeletal muscle myosin loss in response to mechanical silencing in a novel rat intensive care unit model: underlying mechanisms. *J. Physiol.* *589*, 2007–2026.

Oh, J., Richardson, J.A., and Olson, E.N. (2005). Requirement of myocardin-related transcription factor-B for remodeling of branchial arch arteries and smooth muscle differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 15122–15127.

Ohanna, M., Sobering, A.K., Lapointe, T., Lorenzo, L., Praud, C., Petroulakis, E., Sonenberg, N., Kelly, P.A., Sotiropoulos, A., and Pende, M. (2005). Atrophy of S6K1(-/-) skeletal muscle cells reveals distinct mTOR effectors for cell cycle and size control. *Nat. Cell Biol.* *7*, 286–294.

Olichon, A., Baricault, L., Gas, N., Guillou, E., Valette, A., Belenguer, P., and Lenaers, G. (2003). Loss of OPA1 Perturbates the Mitochondrial Inner Membrane Structure and Integrity, Leading to Cytochrome c Release and Apoptosis. *J. Biol. Chem.* *278*, 7743–7746.

Olson, E.N., and Nordheim, A. (2010). Linking actin dynamics and gene transcription to drive cellular motile functions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *11*, 353–365.

Ono, T., Isobe, K., Nakada, K., and Hayashi, J.I. (2001). Human cells are protected from mitochondrial dysfunction by complementation of DNA products in fused mitochondria. *Nat. Genet.* *28*, 272–275.

- Parker, M.H., Seale, P., and Rudnicki, M.A. (2003). Looking back to the embryo: defining transcriptional networks in adult myogenesis. *Nat. Rev. Genet.* *4*, 497–507.
- Parlakian, A., Tuil, D., Hamard, G., Tavernier, G., Hentzen, D., Concordet, J.-P., Paulin, D., Li, Z., and Daegelen, D. (2004). Targeted inactivation of serum response factor in the developing heart results in myocardial defects and embryonic lethality. *Mol. Cell. Biol.* *24*, 5281–5289.
- Parlakian, A., Charvet, C., Escoubet, B., Mericskay, M., Molkentin, J.D., Gary-Bobo, G., De Windt, L.J., Ludosky, M.-A., Paulin, D., Daegelen, D., et al. (2005). Temporally controlled onset of dilated cardiomyopathy through disruption of the SRF gene in adult heart. *Circulation* *112*, 2930–2939.
- Parmacek, M.S. (2007). Myocardin-related transcription factors: critical coactivators regulating cardiovascular development and adaptation. *Circ. Res.* *100*, 633–644.
- Pawłowski, R., Rajakylä, E.K., Vartiainen, M.K., and Treisman, R. (2010). An actin-regulated importin α/β -dependent extended bipartite NLS directs nuclear import of MRTF-A. *EMBO J.* *29*, 3448–3458.
- Perrin, B.J., and Ervasti, J.M. (2010). The actin gene family: function follows isoform. *Cytoskelet. Hoboken NJ* *67*, 630–634.
- Peterson, J.M., Bakkar, N., and Guttridge, D.C. (2011). NF- κ B signaling in skeletal muscle health and disease. *Curr. Top. Dev. Biol.* *96*, 85–119.
- Philippar, U., Schrott, G., Dieterich, C., Müller, J.M., Galgóczy, P., Engel, F.B., Keating, M.T., Gertler, F., Schüle, R., Vingron, M., et al. (2004). The SRF target gene *Fhl2* antagonizes RhoA/MAL-dependent activation of SRF. *Mol. Cell* *16*, 867–880.
- Pipes, G.C.T., Creemers, E.E., and Olson, E.N. (2006). The myocardin family of transcriptional coactivators: versatile regulators of cell growth, migration, and myogenesis. *Genes Dev.* *20*, 1545–1556.
- Polge, C., Heng, A.-E., Jarzaguët, M., Ventadour, S., Claustre, A., Combaret, L., Béchet, D., Matondo, M., Uttenweiler-Joseph, S., Monsarrat, B., et al. (2011). Muscle actin is polyubiquitinated in vitro and in vivo and targeted for breakdown by the E3 ligase MuRF1. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *25*, 3790–3802.
- Pollard, T.D., and Borisy, G.G. (2003). Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell* *112*, 453–465.
- Posern, G., and Treisman, R. (2006). Actin' together: serum response factor, its cofactors and the link to signal transduction. *Trends Cell Biol.* *16*, 588–596.
- Powers, S.K., Duarte, J., Kavazis, A.N., and Talbert, E.E. (2010). Reactive oxygen species are signalling molecules for skeletal muscle adaptation. *Exp. Physiol.* *95*, 1–9.
- Powers, S.K., Wiggs, M.P., Duarte, J.A., Zengeroglu, A.M., and Demirel, H.A. (2012). Mitochondrial signaling contributes to disuse muscle atrophy. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* *303*, E31–39.
- Qaisar, R., Renaud, G., Morine, K., Barton, E.R., Sweeney, H.L., and Larsson, L. (2012). Is functional hypertrophy and specific force coupled with the addition of

myonuclei at the single muscle fiber level? *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **26**, 1077–1085.

Quach, N.L., Biressi, S., Reichardt, L.F., Keller, C., and Rando, T.A. (2009). Focal adhesion kinase signaling regulates the expression of caveolin 3 and beta1 integrin, genes essential for normal myoblast fusion. *Mol. Biol. Cell* **20**, 3422–3435.

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

Dos Remedios, C.G., Chhabra, D., Kekic, M., Dedova, I.V., Tsubakihara, M., Berry, D.A., and Nosworthy, N.J. (2003). Actin binding proteins: regulation of cytoskeletal microfilaments. *Physiol. Rev.* **83**, 433–473.

Romanello, V., Guadagnin, E., Gomes, L., Roder, I., Sandri, C., Petersen, Y., Milan, G., Masiero, E., Del Piccolo, P., Foretz, M., et al. (2010). Mitochondrial fission and remodelling contributes to muscle atrophy. *EMBO J.* **29**, 1774–1785.

Rosenblatt, J.D., and Parry, D.J. (1992). Gamma irradiation prevents compensatory hypertrophy of overloaded mouse extensor digitorum longus muscle. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md* **1985** **73**, 2538–2543.

Rosenblatt, J.D., Yong, D., and Parry, D.J. (1994). Satellite cell activity is required for hypertrophy of overloaded adult rat muscle. *Muscle Nerve* **17**, 608–613.

Sacheck, J.M., Hyatt, J.-P.K., Raffaello, A., Jagoe, R.T., Roy, R.R., Edgerton, V.R., Lecker, S.H., and Goldberg, A.L. (2007). Rapid disuse and denervation atrophy involve transcriptional changes similar to those of muscle wasting during systemic diseases. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **21**, 140–155.

Sakuma, K., Nishikawa, J., Nakao, R., Nakano, H., Sano, M., and Yasuhara, M. (2003). Serum response factor plays an important role in the mechanically overloaded plantaris muscle of rats. *Histochem. Cell Biol.* **119**, 149–160.

Sakuma, K., Akiho, M., Nakashima, H., Akima, H., and Yasuhara, M. (2008). Age-related reductions in expression of serum response factor and myocardin-related transcription factor A in mouse skeletal muscles. *Biochim. Biophys. Acta* **1782**, 453–461.

Sambasivan, R., and Tajbakhsh, S. (2007). Skeletal muscle stem cell birth and properties. *Semin. Cell Dev. Biol.* **18**, 870–882.

Sambasivan, R., Gayraud-Morel, B., Dumas, G., Cimper, C., Paisant, S., Kelly, R.G., Kelly, R., and Tajbakhsh, S. (2009). Distinct regulatory cascades govern extraocular and pharyngeal arch muscle progenitor cell fates. *Dev. Cell* **16**, 810–821.

Sambasivan, R., Yao, R., Kissenpfennig, A., Van Wittenberghe, L., Paldi, A., Gayraud-Morel, B., Guenou, H., Malissen, B., Tajbakhsh, S., and Galy, A. (2011). Pax7-expressing satellite cells are indispensable for adult skeletal muscle regeneration. *Dev. Camb. Engl.* **138**, 3647–3656.

Sandbo, N., Lau, A., Kach, J., Ngam, C., Yau, D., and Dulin, N.O. (2011). Delayed stress fiber formation mediates pulmonary myofibroblast differentiation in response to TGF- β . *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **301**, L656–666.

Sandri, M. (2008). Signaling in muscle atrophy and hypertrophy. *Physiol. Bethesda Md* 23, 160–170.

Sandri, M. (2013). Protein breakdown in muscle wasting: Role of autophagy-lysosome and ubiquitin-proteasome. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*

Sandri, M., Sandri, C., Gilbert, A., Skurk, C., Calabria, E., Picard, A., Walsh, K., Schiaffino, S., Lecker, S.H., and Goldberg, A.L. (2004). Foxo transcription factors induce the atrophy-related ubiquitin ligase atrogin-1 and cause skeletal muscle atrophy. *Cell* 117, 399–412.

Sato, A., Nakada, K., and Hayashi, J.-I. (2006). Mitochondrial dynamics and aging: Mitochondrial interaction preventing individuals from expression of respiratory deficiency caused by mutant mtDNA. *Biochim. Biophys. Acta* 1763, 473–481.

Schiaffino, S., Bormioli, S.P., and Aloisi, M. (1976). The fate of newly formed satellite cells during compensatory muscle hypertrophy. *Virchows Arch. B Cell Pathol.* 21, 113–118.

Schiaffino, S., Dyar, K.A., Ciciliot, S., Blaauw, B., and Sandri, M. (2013). Mechanisms regulating skeletal muscle growth and atrophy. *FEBS J.*

Schratt, G., Weinhold, B., Lundberg, A.S., Schuck, S., Berger, J., Schwarz, H., Weinberg, R.A., Rüther, U., and Nordheim, A. (2001). Serum response factor is required for immediate-early gene activation yet is dispensable for proliferation of embryonic stem cells. *Mol. Cell. Biol.* 21, 2933–2943.

Schratt, G., Philippar, U., Berger, J., Schwarz, H., Heidenreich, O., and Nordheim, A. (2002). Serum response factor is crucial for actin cytoskeletal organization and focal adhesion assembly in embryonic stem cells. *J. Cell Biol.* 156, 737–750.

Schröter, H., Mueller, C.G., Meese, K., and Nordheim, A. (1990). Synergism in ternary complex formation between the dimeric glycoprotein p67SRF, polypeptide p62TCF and the c-fos serum response element. *EMBO J.* 9, 1123–1130.

Schwander, M., Leu, M., Stumm, M., Dorchie, O.M., Rugg, U.T., Schittny, J., and Müller, U. (2003). Beta1 integrins regulate myoblast fusion and sarcomere assembly. *Dev. Cell* 4, 673–685.

Schwarz-Sommer, Z., Huijser, P., Nacken, W., Saedler, H., and Sommer, H. (1990). Genetic Control of Flower Development by Homeotic Genes in *Antirrhinum majus*. *Science* 250, 931–936.

Seale, P., Sabourin, L.A., Girgis-Gabardo, A., Mansouri, A., Gruss, P., and Rudnicki, M.A. (2000). Pax7 is required for the specification of myogenic satellite cells. *Cell* 102, 777–786.

Sebe, A., Masszi, A., Zulys, M., Yeung, T., Speight, P., Rotstein, O.D., Nakano, H., Mucsi, I., Szászi, K., and Kapus, A. (2008). Rac, PAK and p38 regulate cell contact-dependent nuclear translocation of myocardin-related transcription factor. *FEBS Lett.* 582, 291–298.

Selvaraj, A., and Prywes, R. (2003). Megakaryoblastic leukemia-1/2, a transcriptional co-activator of serum response factor, is required for skeletal myogenic differentiation. *J. Biol. Chem.* 278, 41977–41987.

Shea, K.L., Xiang, W., LaPorta, V.S., Licht, J.D., Keller, C., Basson, M.A., and Brack, A.S. (2010). Sprouty1 regulates reversible quiescence of a self-renewing adult muscle stem cell pool during regeneration. *Cell Stem Cell* 6, 117–129.

Shore, P., and Sharrocks, A.D. (1995). The MADS-box family of transcription factors. *Eur. J. Biochem. FEBS* 229, 1–13.

Smith, L.R., Meyer, G., and Lieber, R.L. (2013). Systems analysis of biological networks in skeletal muscle function. *Wiley Interdiscip. Rev. Syst. Biol. Med.* 5, 55–71.

Sorimachi, H., Imajoh-Ohmi, S., Emori, Y., Kawasaki, H., Ohno, S., Minami, Y., and Suzuki, K. (1989). Molecular cloning of a novel mammalian calcium-dependent protease distinct from both m- and mu-types. Specific expression of the mRNA in skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* 264, 20106–20111.

Sotiropoulos, A., Gineitis, D., Copeland, J., and Treisman, R. (1999). Signal-regulated activation of serum response factor is mediated by changes in actin dynamics. *Cell* 98, 159–169.

Soulez, M., Rouviere, C.G., Chafey, P., Hentzen, D., Vandromme, M., Lautredou, N., Lamb, N., Kahn, A., and Tuil, D. (1996). Growth and differentiation of C2 myogenic cells are dependent on serum response factor. *Mol. Cell. Biol.* 16, 6065–6074.

Spencer, J.A., Eliazer, S., Ilaria, R.L., Jr, Richardson, J.A., and Olson, E.N. (2000). Regulation of microtubule dynamics and myogenic differentiation by MURF, a striated muscle RING-finger protein. *J. Cell Biol.* 150, 771–784.

Stüven, T., Hartmann, E., and Görlich, D. (2003). Exportin 6: a novel nuclear export receptor that is specific for profilin.actin complexes. *EMBO J.* 22, 5928–5940.

Sun, K., Battle, M.A., Misra, R.P., and Duncan, S.A. (2009). Hepatocyte expression of serum response factor is essential for liver function, hepatocyte proliferation and survival, and postnatal body growth in mice. *Hepatology. Baltim. Md* 49, 1645–1654.

Sun, Q., Chen, G., Streb, J.W., Long, X., Yang, Y., Stoeckert, C.J., Jr, and Miano, J.M. (2006a). Defining the mammalian CArGome. *Genome Res.* 16, 197–207.

Sun, Y., Boyd, K., Xu, W., Ma, J., Jackson, C.W., Fu, A., Shillingford, J.M., Robinson, G.W., Hennighausen, L., Hitzler, J.K., et al. (2006b). Acute myeloid leukemia-associated Mkl1 (Mrtf-a) is a key regulator of mammary gland function. *Mol. Cell. Biol.* 26, 5809–5826.

Talbert, E.E., Smuder, A.J., Min, K., Kwon, O.S., Szeto, H.H., and Powers, S.K. (2013). IMMOBILIZATION-INDUCED ACTIVATION OF KEY PROTEOLYTIC SYSTEMS IN SKELETAL MUSCLES IS PREVENTED BY A MITOCHONDRIA-TARGETED ANTIOXIDANT. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md* 1985.

Tintignac, L.A., Lagirand, J., Batonnet, S., Sirri, V., Leibovitch, M.P., and Leibovitch, S.A. (2005). Degradation of MyoD mediated by the SCF (MAFbx) ubiquitin ligase. *J. Biol. Chem.* 280, 2847–2856.

Treisman, R. (1987). Identification and purification of a polypeptide that binds to the c-fos serum response element. *EMBO J.* 6, 2711–2717.

- Tskhovrebova, L., and Trinick, J. (2003). Titin: properties and family relationships. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *4*, 679–689.
- Tyedmers, J., Mogk, A., and Bukau, B. (2010). Cellular strategies for controlling protein aggregation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *11*, 777–788.
- Vartiainen, M.K., Guettler, S., Larijani, B., and Treisman, R. (2007). Nuclear actin regulates dynamic subcellular localization and activity of the SRF cofactor MAL. *Science* *316*, 1749–1752.
- Visa, N., and Percipalle, P. (2010). Nuclear functions of actin. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *2*, a000620.
- Wang, Y.X., and Rudnicki, M.A. (2012). Satellite cells, the engines of muscle repair. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *13*, 127–133.
- Wang, D., Chang, P.S., Wang, Z., Sutherland, L., Richardson, J.A., Small, E., Krieg, P.A., and Olson, E.N. (2001). Activation of cardiac gene expression by myocardin, a transcriptional cofactor for serum response factor. *Cell* *105*, 851–862.
- Wang, D., Prakash, J., Nguyen, P., Davis-Dusenbery, B.N., Hill, N.S., Layne, M.D., Hata, A., and Lagna, G. (2012). Bone morphogenetic protein signaling in vascular disease: anti-inflammatory action through myocardin-related transcription factor A. *J. Biol. Chem.* *287*, 28067–28077.
- Wang, Z., Wang, D.-Z., Pipes, G.C.T., and Olson, E.N. (2003). Myocardin is a master regulator of smooth muscle gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 7129–7134.
- Werth, D., Grassi, G., Konjer, N., Dapas, B., Farra, R., Giansante, C., Kandolf, R., Guarnieri, G., Nordheim, A., and Heidenreich, O. (2010). Proliferation of human primary vascular smooth muscle cells depends on serum response factor. *Eur. J. Cell Biol.* *89*, 216–224.
- Whitehouse, A.S., and Tisdale, M.J. (2003). Increased expression of the ubiquitin-proteasome pathway in murine myotubes by proteolysis-inducing factor (PIF) is associated with activation of the transcription factor NF-kappaB. *Br. J. Cancer* *89*, 1116–1122.
- Wickramasinghe, S.R., Alvania, R.S., Ramanan, N., Wood, J.N., Mandai, K., and Ginty, D.D. (2008). Serum response factor mediates NGF-dependent target innervation by embryonic DRG sensory neurons. *Neuron* *58*, 532–545.
- Wilcox-Adelman, S.A., Denhez, F., and Goetinck, P.F. (2002). Syndecan-4 modulates focal adhesion kinase phosphorylation. *J. Biol. Chem.* *277*, 32970–32977.
- Williams, A.B., Decourten-Myers, G.M., Fischer, J.E., Luo, G., Sun, X., and Hasselgren, P.O. (1999). Sepsis stimulates release of myofilaments in skeletal muscle by a calcium-dependent mechanism. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *13*, 1435–1443.
- Woods, A., and Couchman, J.R. (2001). Syndecan-4 and focal adhesion function. *Curr. Opin. Cell Biol.* *13*, 578–583.

- Ben-Yair, R., and Kalcheim, C. (2005). Lineage analysis of the avian dermomyotome sheet reveals the existence of single cells with both dermal and muscle progenitor fates. *Dev. Camb. Engl.* *132*, 689–701.
- Yang, S.H., Shore, P., Willingham, N., Lakey, J.H., and Sharrocks, A.D. (1999). The mechanism of phosphorylation-inducible activation of the ETS-domain transcription factor Elk-1. *EMBO J.* *18*, 5666–5674.
- Yin, H., Price, F., and Rudnicki, M.A. (2013). Satellite cells and the muscle stem cell niche. *Physiol. Rev.* *93*, 23–67.
- Zanou, N., and Gailly, P. (2013). Skeletal muscle hypertrophy and regeneration: interplay between the myogenic regulatory factors (MRFs) and insulin-like growth factors (IGFs) pathways. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS.*
- Zhao, X.-H., Laschinger, C., Arora, P., Szász, K., Kapus, A., and McCulloch, C.A. (2007). Force activates smooth muscle α -actin promoter activity through the Rho signaling pathway. *J. Cell Sci.* *120*, 1801–1809.
- Zheng, B., Han, M., Bernier, M., and Wen, J. (2009). Nuclear actin and actin-binding proteins in the regulation of transcription and gene expression. *FEBS J.* *276*, 2669–2685.
- Zhou, Y., Huang, X., Hecker, L., Kurundkar, D., Kurundkar, A., Liu, H., Jin, T.-H., Desai, L., Bernard, K., and Thannickal, V.J. (2013). Inhibition of mechanosensitive signaling in myofibroblasts ameliorates experimental pulmonary fibrosis. *J. Clin. Invest.* *123*, 1096–1108.
- Zimmers, T.A., Davies, M.V., Koniaris, L.G., Haynes, P., Esquela, A.F., Tomkinson, K.N., McPherron, A.C., Wolfman, N.M., and Lee, S.-J. (2002). Induction of cachexia in mice by systemically administered myostatin. *Science* *296*, 1486–1488.

ANNEXES

Présentations à des congrès

Octobre 2012 (Paris - France) : poster au Congrès des Jeunes Chercheurs de l'Université Paris Descartes

Juin 2012 (New York, NY - USA) : poster et communication orale au congrès Development, Function and Repair of the Muscle Cell

Mars 2012 (Paris - France) : poster aux Journées de l'Ecole Doctorale GC2iD

Mai 2012 (Paris - France) : communication orale au congrès Young Researchers in Life Sciences

Octobre 2011 (Paris - France) : poster au Congrès des Jeunes Chercheurs de l'Université Paris Descartes

Octobre 2011 (Lyon - France) : communication orale au XIVe Club Muscle

Septembre 2011 (Boston, MA - USA) : poster au congrès New Horizons in Myogenesis

Novembre 2010 (Nice - France) : poster aux Journées Annuelles de la Société Française de Myologie

Liste des publications

The actin/Mrtfs/Srf axis is a key pathway controlling disuse muscle atrophy.

Collard, L., Guerci, A., Daegelen, D. and Sotiropoulos, A.

(en cours de re-soumission)

Srf-Dependent Paracrine Signals Produced by Myofibers Control Satellite Cell-Mediated Skeletal Muscle Hypertrophy.

Guerci, A., Lahoute, C., Hébrard, S., Collard, L., Graindorge, D., Favier, M., Cagnard, N., Batonnet-Pichon, S., Précigout, G., Garcia, L., et al. (2012).

Cell Metab. 15, 25–37.

Srf-Dependent Paracrine Signals Produced by Myofibers Control Satellite Cell-Mediated Skeletal Muscle Hypertrophy

Aline Guerci,^{1,2,8} Charlotte Lahoute,^{1,2,4,8} Sophie Hébrard,^{1,2,4} Laura Collard,^{1,2,4} Dany Graindorge,^{1,2,4} Maryline Favier,^{1,2,4} Nicolas Cagnard,³ Sabrina Battonnet-Pichon,^{1,2,4} Guillaume Précigout,^{5,6,7} Luis Garcia,^{5,6,7} David Tuil,^{1,2,4} Dominique Daegelen,^{1,2,4} and Athanassia Sotiropoulos^{1,2,4,*}

¹Inserm U1016, Institut Cochin, F-75014 Paris, France

²CNRS UMR8104, F-75014 Paris, France

³Bioinformatic Platform, Université Paris Descartes, F-75006 Paris, France

⁴Université Paris Descartes, F-75006 Paris, France

⁵Inserm U974, Institut de Myologie, F-75013 Paris, France

⁶CNRS, UMR7215, F-75013 Paris, France

⁷Université Pierre et Marie Curie, F-75005 Paris, France

⁸These authors contributed equally to this work

*Correspondence: athanassia.sotiropoulos@inserm.fr

DOI 10.1016/j.cmet.2011.12.001

SUMMARY

Adult skeletal muscles adapt their fiber size to workload. We show that serum response factor (Srf) is required for satellite cell-mediated hypertrophic muscle growth. Deletion of *Srf* from myofibers and not satellite cells blunts overload-induced hypertrophy, and impairs satellite cell proliferation and recruitment to pre-existing fibers. We reveal a gene network in which Srf within myofibers modulates *interleukin-6* and *cyclooxygenase-2/interleukin-4* expressions and therefore exerts a paracrine control of satellite cell functions. In *Srf*-deleted muscles, *in vivo* overexpression of *interleukin-6* is sufficient to restore satellite cell proliferation but not satellite cell fusion and overall growth. In contrast *cyclooxygenase-2/interleukin-4* overexpression rescue satellite cell recruitment and muscle growth without affecting satellite cell proliferation, identifying altered fusion as the limiting cellular event. These findings unravel a role for Srf in the translation of mechanical cues applied to myofibers into paracrine signals, which in turn will modulate satellite cell functions and support muscle growth.

INTRODUCTION

Adult skeletal muscle is a highly plastic tissue, the mass of which changes in response to environmental cues and physiological stimuli. The basic cellular building blocks of adult muscle are the multinucleated myofibers, which are able to grow during postnatal growth, during regeneration after injury, and in response to a functional demand, such as external loads.

Mature myofibers can grow following the addition of new contractile proteins to pre-existing sarcomere units, which involve

the phosphatidylinositol 3-kinase PI3K/Akt signaling pathway. Anabolic hormones, such as insulin-like growth factor 1 (IGF1), induce myofiber hypertrophy by activating the Akt1 pathway and the translational machinery through mTOR, S6K1, and 4E-BP1 (Glass, 2010). Postmitotic myofiber growth can also result from the accretion of new nuclei provided by muscle stem cells called satellite cells. Once activated in response to the adaptive requirements of the muscle, satellite cells go through an ordered series of events, including proliferation, migration, and fusion to growing myofibers (Le Grand and Rudnicki, 2007).

A large set of growth factors and cytokines modulate the proliferation and differentiation of satellite cells (Kuang et al., 2008). Among these, interleukin 6 (Il6), a myokine detected at high concentrations in contracting muscle fibers and after increased load (Carson et al., 2002; Penkowa et al., 2003), enhances satellite cell proliferation and migration during muscle hypertrophy (Serrano et al., 2008). Muscle-secreted interleukin 4 (Il4) promotes muscle regeneration and postnatal growth by facilitating the migration of myoblasts (Lafreniere et al., 2006) and the fusion of myoblasts to nascent myotubes (Horsley et al., 2003). Prostaglandins produced by cyclooxygenase (Cox) enzymes, which catalyze the rate-limiting step in their synthesis, are bioactive lipid mediators that can also regulate satellite cell behavior. In particular, Cox2 isoform activity and Cox2-derived prostaglandins modulate satellite cell proliferation, migration, and fusion (Bondesen et al., 2007; Otis et al., 2005; Shen et al., 2006).

Although significant progress has been made in understanding the signaling pathways that control muscle mass, the molecules that sense muscle overload and translate it into signals that support hypertrophy are unclear. Furthermore, very little is known about the transcription factors and target genes that are involved in promoting adult muscle growth.

Serum response factor (Srf) is a ubiquitously expressed transcription factor that binds the CARG box sequence. One major class of Srf targets is expressed specifically in muscles and comprises several genes encoding sarcomeric proteins

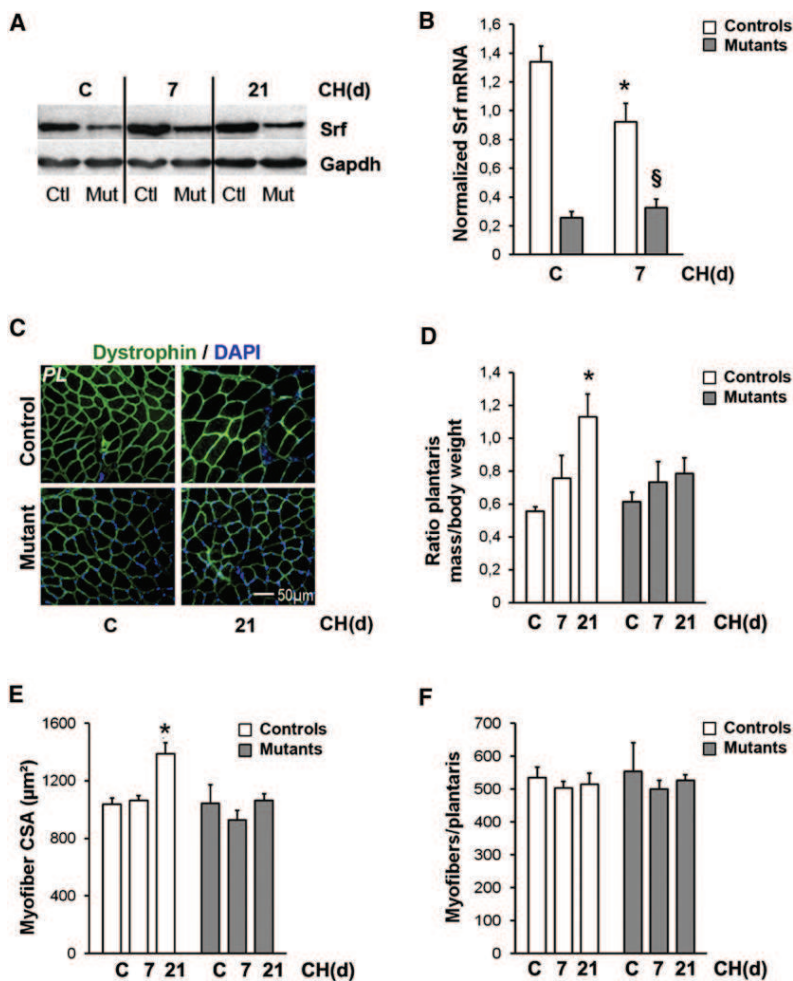


Figure 1. Srf Loss within Myofiber Impairs Overload-Induced Muscle Hypertrophy

Control and *Srf*-deleted (mutant) *plantaris* muscles were obtained from nonoverloaded mice (c) and after 7 and 21 days of compensatory hypertrophy (CH).

(A) *Srf* protein was analyzed by western blotting. Gapdh was used as a loading control.

(B) *Srf* mRNA expression was analyzed by qRT-PCR in *plantaris* muscles from control and mutant mice before (c) and after 7 days of CH. Data (mean ± SEM) were normalized by *18S rRNA* expression. * $p < 0.05$ versus controls (c); § $p < 0.05$ versus controls (7).

(C) Muscle sections immunostained for dystrophin and nuclear staining with DAPI from control and mutant mice before (c) and after 21 days of CH.

(D) Ratio of *plantaris* mass (mg) to body weight (g) before (c) and after 7 and 21 days of CH in control and mutant mice. Data are mean ± SEM. * $p < 0.01$ versus controls (c).

(E) Mean CSA (± SEM) of muscle fibers before (c) and after 7 and 21 days of CH in control and mutant mice. * $p < 0.05$ versus c.

(F) Mean myofiber number (± SEM) before (c) and after 7 and 21 days of CH in control and mutant mice.

(Pipes et al., 2006). The Rho family of small GTPases and actin dynamics has been shown to modulate Srf activity by controlling the nuclear accumulation of its coactivator, myocardin-related transcription factor A (Mrtf-A) (Miralles et al., 2003). Data obtained from mouse models with skeletal muscle-specific loss of *Srf* or *Mrtfs* functions emphasize their crucial role in postnatal muscle growth (Charvet et al., 2006; Li et al., 2005). In adults, Srf activity could also be important for the control of skeletal muscle growth, as suggested by increased Srf expression during overload-induced hypertrophy (Flück et al., 1999). In cardiac muscle, Srf and Mrtf-A are necessary for mediating cardiomyocyte hypertrophy (Kuwahara et al., 2010; Parlakian et al., 2005). Taken together, these data point toward Srf as a good candidate transcription factor in the control of skeletal muscle mass during hypertrophy.

To examine the role of Srf during overload-induced muscle hypertrophy, and the underlying cellular and molecular mechanisms, we used a mouse model of conditional and inducible deletion of *Srf* within myofibers but not in satellite cells (Lahoute et al., 2008). We show here that *plantaris* myofibers lacking Srf are no longer able to display a hypertrophic response when subjected to an experimental overload, thus revealing the requirement of Srf for muscle growth response to increased

activity. Using a combination of in vivo and in vitro assays, we demonstrate that this hypertrophic growth defect is due to lack of satellite cell proliferation and fusion to the pre-existing myofibers, independent of the IGF1/Akt pathway. We show that impaired production of secreted factors by myofibers lacking Srf is responsible for these defects. We also unraveled a gene network associating *Srf*, *Il6*, *Il4*, and *Cox2* genes, which drive overload-induced muscle growth. By modulating *Il6*, *Cox2/Il4* expression levels in the myofibers, Srf controls both satellite cell proliferation and fusion. Altogether, these data identify Srf as a crucial transcription factor required for the translation of mechanical cues applied to the myofibers into paracrine signals that support the proliferation and fusion of satellite cells, leading to muscle growth.

RESULTS

Srf Is Required for Overload-Induced Hypertrophy

To investigate the role of Srf in skeletal muscle hypertrophy, compensatory hypertrophy (CH) of the *plantaris* muscle was performed in HSA-Cre-ER^{T2}:Srf^{fllox/fllox} mutant mice previously tamoxifen-injected to induce myofiber-specific *Srf* loss. In addition, control and mutant mice were injected with tamoxifen during the CH procedure. Efficient Srf loss was achieved at the protein (Figure 1A) and transcript levels (Figure 1B). As previously described, no obvious differences in muscle mass, myofiber cross-sectional area (CSA), and myofiber number were observed between control and mutant *plantaris* muscles before overload (Figures 1C–1F, and Lahoute et al., 2008). In this muscle growth model, we observed a significant increase in muscle mass (Figure 1D) and the myofibers CSA of control muscles 21 days after overload (Figure 1E), which was not accompanied by a modification of fiber number (Figure 1F). In

Cell Metabolism

Control of Skeletal Muscle Hypertrophy by Srf

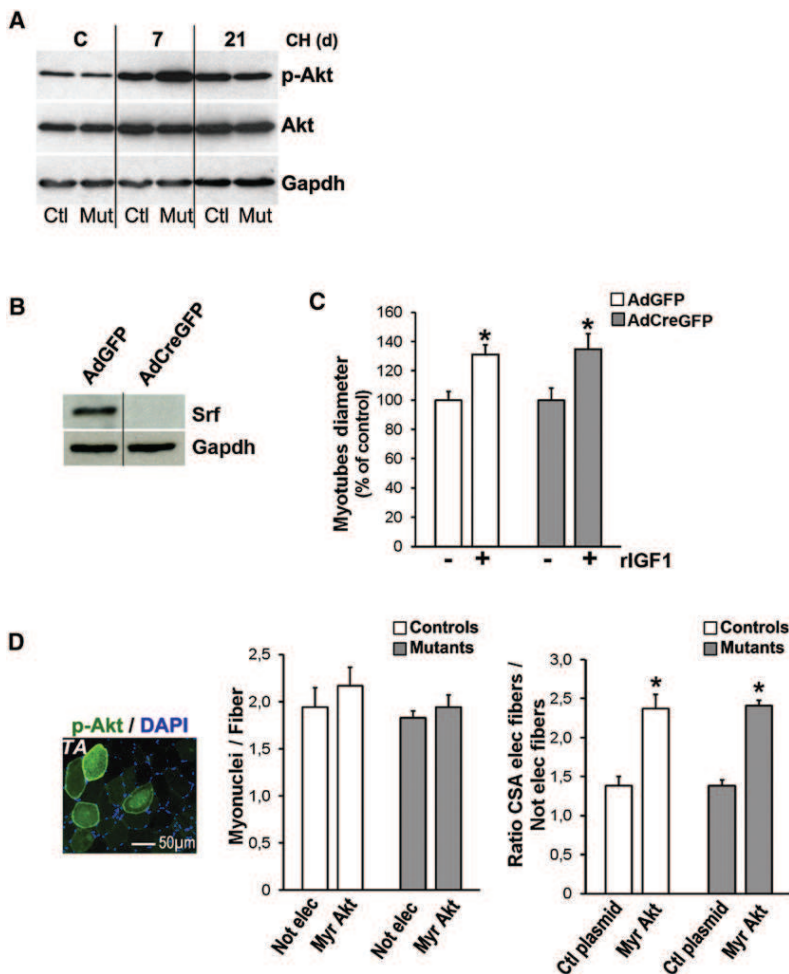


Figure 2. Srf Is Not Required for IGF1/Akt-Dependent muscle growth

(A) Phosphorylated Akt and total Akt proteins were analyzed by western blotting from muscle samples obtained from nonoverloaded mice (c) and after 7 and 21 days of compensatory hypertrophy (CH). Gapdh was used as a loading control.

(B) Myotubes ($Srf^{flox/flox}$) were transduced with AdGFP or AdCreGFP (*Srf* deleted) adenoviruses; 48 hr later they were treated or not with recombinant 250 ng/ml IGF1 (rIGF1) for an additional 48 hr. Srf protein expression was analyzed by western blotting. Gapdh was used as a loading control.

(C) Myotube diameter was measured after AdCreGFP or AdGFP transduction and after treatment with rIGF1 or not (-). Data are mean \pm SEM. * $p < 0.05$ versus not treated (-). (D) *Tibialis* muscles were electroporated with control (Ctl) or Myr-Akt plasmids and isolated 10 days later. Immunostaining for P-Akt (green) and nuclear staining with DAPI illustrated Myr-Akt electroporation. Numbers of DAPI-stained nuclei within the dystrophin-positive sarcolemma were counted in nonelectroporated (Nonelec) and Myr-Akt-electroporated fibers and are expressed per fiber. Ratio of fiber CSA in electroporated (with Ctl or Myr-Akt plasmids) or versus nonelectroporated fibers was measured in control and mutant *tibialis* muscles. Data are mean \pm SEM. * $p < 0.05$ versus Ctl plasmid.

contrast, growth was completely blunted in mutant muscles (Figures 1C–E), showing that Srf is necessary for overload-induced myofiber hypertrophy.

Srf Is Dispensable for IGF1/Akt-Dependent Muscle Growth

We investigated the possibility of an alteration in Akt signaling in mutant muscle. As illustrated in Figure 2A, we observed no difference in activated Akt levels between control and mutant muscles at the different times examined after overloading, indicating that *Srf* deletion in the myofiber does not affect Akt signaling and that the lack of growth observed in mutant muscle is not the consequence of altered Akt signaling.

We then determined whether Srf is needed for the recruitment of new nuclei to the growing myofiber and/or an increase in the cytoplasmic volume. Having previously shown that myotubes treated with IGF1 increase in size with no associated increase of their nuclei number (Ohanna et al., 2005), we assessed whether myotubes lacking Srf were responsive to IGF1-induced hypertrophy in culture. The loss of Srf was obtained by transducing myotubes ($Srf^{flox/flox}$) with an adenovirus driving Cre recombinase expression (AdCre) (Figure 2B). IGF1 treatment led to a similar increase in myotube diameter in both Srf-

expressing and non-Srf-expressing myotubes (Figure 2C). In addition, *in vivo* overexpression of a constitutively active form of Akt1 (Myr-Akt) can be used to induce muscle hypertrophy involving myofiber volume increase without satellite cell fusion (Blaauw et al., 2009). Accordingly, following *in vivo* gene transfer of a Myr-Akt vector in control and mutant *tibialis* muscles, we observed the same number of myonuclei in both

Myr-Akt-expressing and non-Myr-Akt-expressing myofibers (Figure 2D, middle). Similar levels of hypertrophy were observed in control and mutant Myr-Akt electroporated muscles, showing that Srf is not required for *in vivo* Myr-Akt-induced hypertrophy (Figure 2D, right). Taken together, these data demonstrate that Srf is not required for IGF1/Akt-induced skeletal muscle hypertrophy, which depends exclusively on an increase in the cytoplasmic volume.

Srf Loss within Myofibers Impairs Satellite Cell Functions

To analyze the consequences of *Srf* loss within myofibers on satellite cell proliferation *in vivo* during CH, the number of satellite cells expressing both Pax7 (a marker of satellite cells) and Ki67 (a marker of cycling cells) was quantified. Before CH, the number of quiescent satellite cells (Pax7⁺) was similar in control and mutant *plantaris* muscles (Figure 3B, left). In contrast, 3 and 7 days after overloading, the number of Pax7⁺Ki67⁺ cells was significantly lower in mutant muscles compared to controls, showing that in the absence of Srf within myofibers, satellite cells present a decreased rate of proliferation (Figure 3B, right). Accordingly, 7 days post-CH, the number of Pax7⁺ cells was diminished in mutant muscles (Figures 3A and 3B, left). This

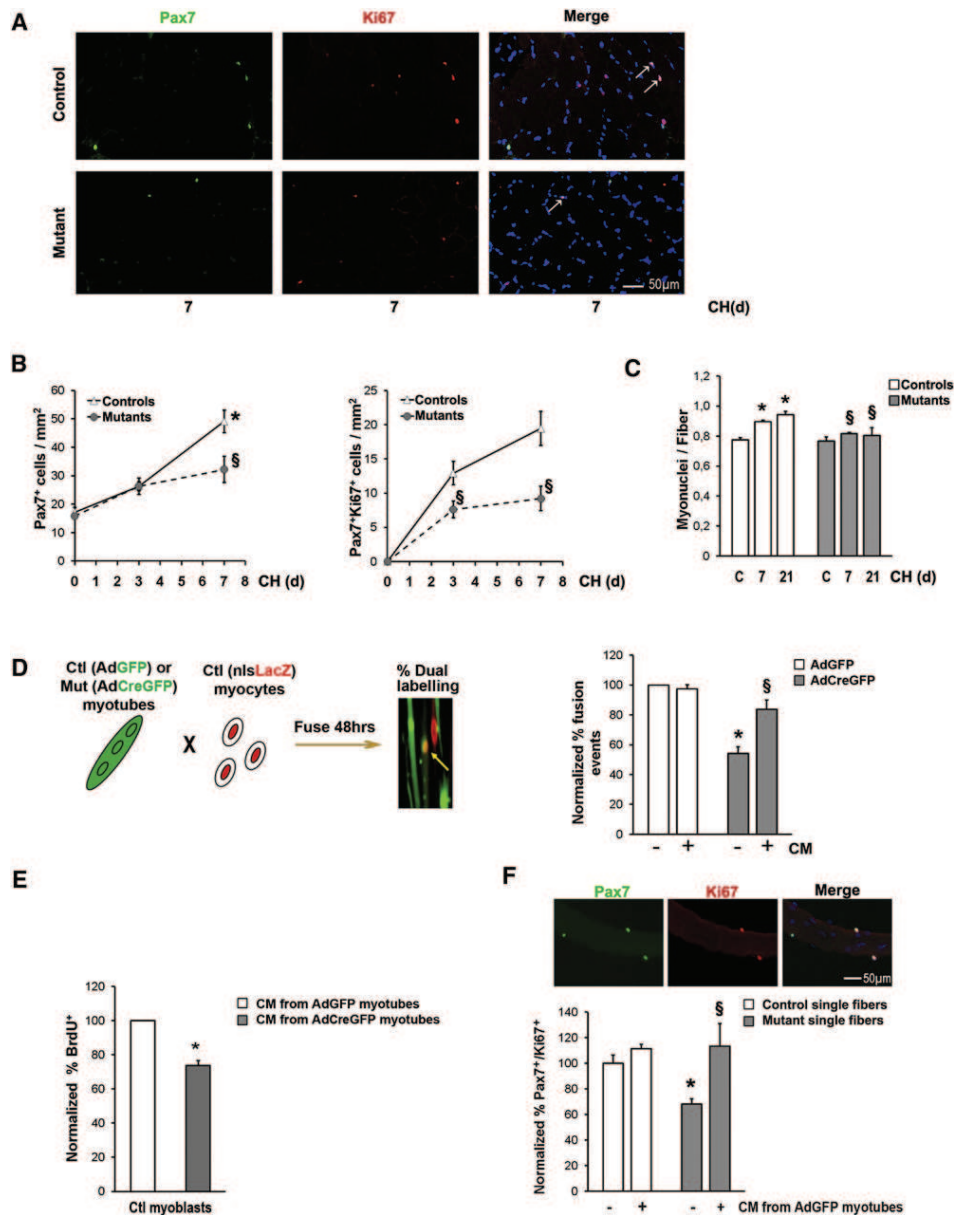


Figure 3. Srf-Dependent Paracrine Control of Satellite Cell Proliferation and Fusion

(A) Immunostaining for Pax7 (green) and Ki67 (red) to illustrate cycling satellite cells (Pax7⁺Ki67⁺, white arrow) after 7 days of CH in control or mutant *plantaris* muscles.

(B) Numbers of Pax7⁺ cells per mm² and Pax7⁺Ki67⁺ cells per mm² were quantified in control and mutant *plantaris* muscle sections before (c) and after 3 and 7 days of CH. Data are mean ± SEM. *p < 0.05 versus controls (0); §p < 0.05 versus controls.

(C) Number of DAPI-stained nuclei within the dystrophin-positive sarcolemma was counted before (c) and after 7 and 21 days of CH and are expressed per fiber. Data are mean ± SEM. *p < 0.05 versus (c); §p < 0.05 versus controls.

(D) Myotubes transduced with AdGFP (Ctl) or AdCreGFP (Mut) were labeled in green (cell tracker) and mixed with Ctl myocytes labeled in red (expressing nlsLacZ). After 48 hr of coculture, myotubes were analyzed for dual labeling. Representative picture of the dual labeling: immunostaining for LacZ and GFP/green cell tracker (yellow arrow). Normalized percentage of fusion events: % of dual labeled myotubes/LacZ cells of myotubes transduced with AdGFP or AdCreGFP cultured without (-) or with (+) conditioned medium (CM) from control myotubes. Data are mean ± SEM. *p < 0.05 versus AdGFP(-CM), §p < 0.05 versus AdCreGFP(-CM).

(E) Normalized percentage of BrdU⁺ cells in control myoblasts cultured with or without CM from myotubes transduced with AdGFP or AdCreGFP. Data are mean ± SEM. *p < 0.05 versus CM from AdGFP.

(F) Immunostaining for Pax7 (green) and Ki67 (red) to illustrate satellite cells (Pax7⁺) and cycling satellite cells (Pax7⁺Ki67⁺) on single fibers. Normalized percentage of cycling satellite cells (Pax7⁺Ki67⁺ over Pax7⁺ cells) on single fibers isolated from control or mutant *EDL* muscles cultured with or without CM from control myotubes. Data are mean ± SEM. *p < 0.05 versus control, §p < 0.05 versus mutant.

Cell Metabolism

Control of Skeletal Muscle Hypertrophy by Srf

decreased proliferation was not accompanied by increased cell death as assessed by TUNEL (Figure S1, available online). These data demonstrate that the presence of Srf within the myofibers is critical for stimulating efficient satellite cell proliferation in response to overload.

To investigate whether the lack of Srf in myofibers might also affect satellite cell fusion to mutant myofibers, myonuclei numbers were determined in control and mutant *plantaris* muscles at various time points post-CH. Although significant increases in myonuclei numbers were observed in control muscles at 7 and 21 days post-CH, no such increases were observed in mutant muscles (Figure 3C). Because decreased satellite cell proliferation in mutant muscles may impede new nuclei accretion, we set up an in vitro assay to specifically assess whether the absence of Srf within myotubes (green) affects fusion with Srf-expressing mononucleated myocytes (nls-lacZ, red) (Figure 3D, top). The lack of Srf expression in myotubes was accompanied by a 50% decrease in fusion events (dual-labeling, Figure 3D) compared to the control myotubes. These data show that Srf plays an important role within the myofibers in controlling satellite cell recruitment.

Altogether, the lack of growth of Srf deficient myofibers in response to increased load could result from decreased satellite cell proliferation and decreased ability to fuse to the growing myofibers.

Srf-Dependent Paracrine Control of Myoblast Proliferation and Fusion to Myotubes

In this genetic model, *Srf* deletion occurs in myofibers of mutant muscles but never in quiescent satellite cells or in satellite cells engaged in differentiation/fusion (myocytes). Indeed, satellite cells isolated from mutant single myofibers (from tamoxifen-injected HSA-Cre-ER^{T2}: Srf^{fllox/fllox} mice) did not display an excision of floxed *Srf* allele as opposed to the whole muscle (Figure S2A). In addition, *Srf* deletion did not occur in fusing HSA-Cre-ER^{T2}: Srf^{fllox/fllox} myocytes (day 1 of differentiation) treated with tamoxifen but was observed in terminally differentiated HSA-Cre-ER^{T2}: Srf^{fllox/fllox} myotubes (day 5 of differentiation) after tamoxifen addition (Figure S2B).

We further checked control and mutant muscle-growth responses in conditions excluding Cre-ER^{T2} activation in myofibers and in satellite cells during the overloading process. Because Cre-ER^{T2} protein is only active in the presence of tamoxifen, control and mutant mice were injected with tamoxifen only prior to and not during CH. The complete lack of hypertrophy observed in mutant muscles as compared to control muscles 21 days post-CH reinforced our idea that the loss of *Srf* only within myofibers is responsible for the absence of growth of mutant muscles (Figure S2C).

We therefore hypothesized that during CH myofibers exert a paracrine control of satellite cell proliferation and fusion via Srf. The potential involvement of factors secreted from the myofibers on satellite cell proliferation was first assessed in vitro by determining the BrdU incorporation rate of control myoblasts in response to conditioned medium (CM) issued from both Srf-expressing and non-Srf-expressing myotubes. CM from myotubes lacking Srf (AdCreGFP-transduced) stimulated myoblast proliferation to a much lesser extent than CM from control myotubes (AdGFP) (Figure 3E). We further moni-

tored the percentage of cycling satellite cells (Pax7⁺Ki67⁺ over Pax7⁺) on single-fiber cultures from control and mutant muscles cultivated in differentiation media (2% HS) or in presence of CM issued from Srf-expressing myotubes. The normalized proportion of cycling satellite cells was significantly decreased in mutant single fibers in comparison with control single fibers and was restored to control level in presence of CM (Figure 3F). Thus, the presence of Srf within myofiber/myotube is necessary for controlling the expression of secreted factors that promote adequate satellite cell/myoblast proliferation in vitro.

Whether an alteration of the set of factors secreted by mutant myofibers could be responsible for inefficient satellite cell fusion was also investigated in vitro. CM from control myotubes almost totally rescued the fusion defect of control myocytes to myotubes lacking Srf (Figure 3D). These data suggested that CM from control myotubes contained secreted factors that are no longer produced in Srf-depleted myotubes.

Taken together, these findings highlight a previously undiscovered contribution of Srf within myofibers in controlling the expression of secreted factors that are necessary for promoting the proliferation of muscle satellite cells and their fusion to pre-existing myofibers during CH.

To identify molecular Srf target genes that control satellite cell functions, we performed a microarray analysis of gene expression. Two conditions were used: Srf^{fllox/fllox} myotubes were transduced with either AdGFP or AdSRFVP16 driving the expression of a constitutively active Srf derivative. Among the genes whose expression was induced by SRFVP16, a certain number of known Srf targets serving as positive controls for the suitability of the approach were found (Table S1, indicated in italics). Following qRT-PCR validation, attention was focused on genes encoding secreted factors that were differentially expressed between overloaded mutant and control muscles (data not shown). This was the case for *Il6*, whose role in Srf-dependent CH was tested as detailed hereafter.

Il6 Rescues Satellite Cell proliferation but not Muscle Growth

Il6 has previously been shown to control satellite cell proliferation in a paracrine manner (Serrano et al., 2008). First, we investigate a possible Srf-dependent regulation of *Il6* expression. Although a 2.7-fold increase in *Il6* expression in gain-of-function myotubes was observed 2 days post-AdSRFVP16 transduction, *Il6* expression decreased by more than half in the absence of Srf 3 days post-AdCreGFP transduction (Figure 4A). In vivo, 7 days post-overload, the level of *Il6* transcripts had greatly increased in control *plantaris* muscles, whereas only a faint increase was detected in mutant muscles (Figure 4B). Taken together, these data reveal an impaired *Il6* expression in growing muscles lacking *Srf*, which is intrinsic to muscle myofibers.

To evaluate the contribution of decreased *Il6* expression to the lack of growth of *Srf*-deleted myofibers, control and mutant *plantaris* muscles were injected with an adeno-associated virus (AAV) driving *Il6* expression (AAV-IL6) 3 weeks prior to CH. *Plantaris* muscles were isolated 7 and 14 days post-CH (Figure 4C). A significant increase in *Il6* expression was measured in *plantaris* muscle injected with AAV-IL6 as

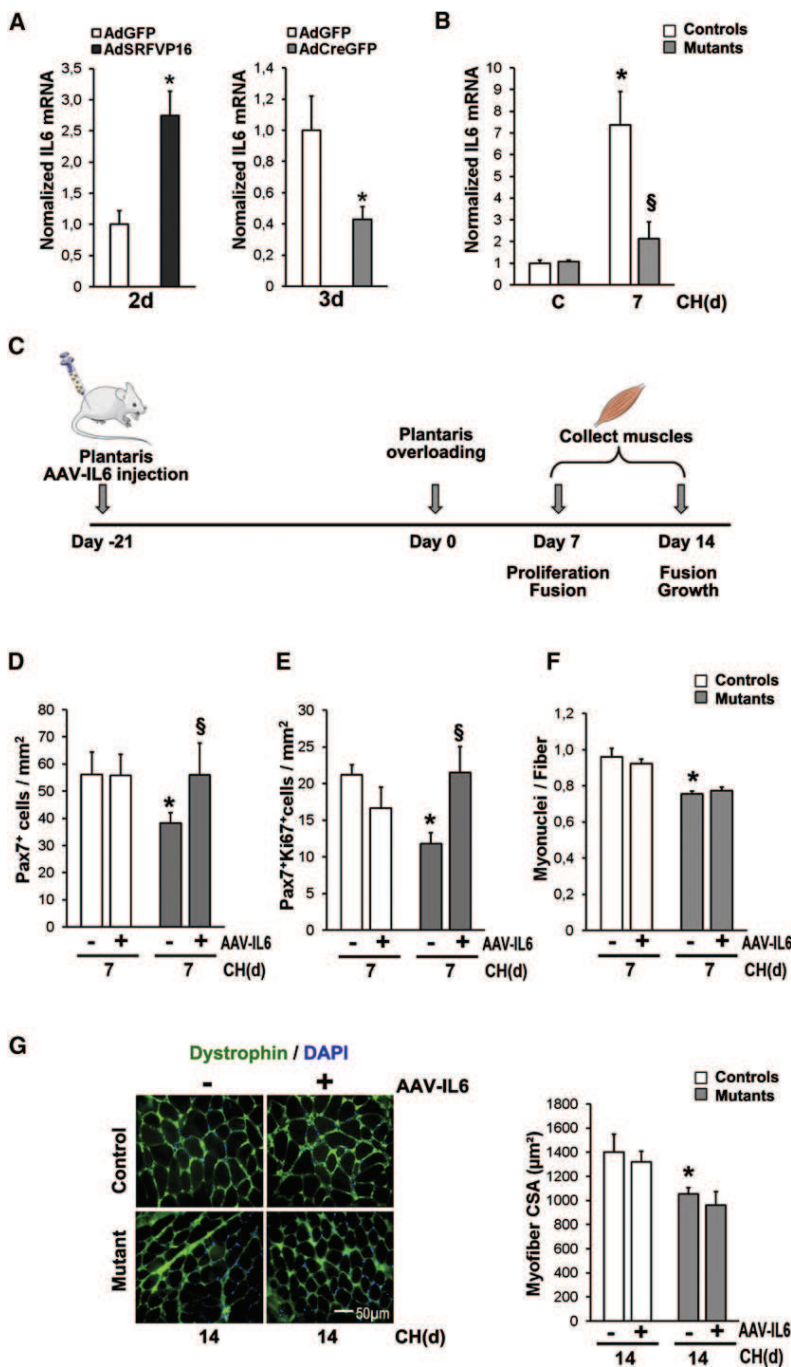


Figure 4. *Il6* Overexpression Rescues Satellite Cell Proliferation but Not Overload-Induced Muscle Growth

(A) *Il6* mRNA expression was analyzed by qRT-PCR in myotubes (*SRF*^{fl^{ox}/fl^{ox}) transduced with AdGFP or AdCreGFP for 72 hr or with AdSRFVP16 for 48 hr. Data (mean ± SEM) are normalized by *cyclophilin* expression and presented as fold-induction relative to AdGFP. **p* < 0.05 versus AdGFP.}

(B) *Il6* mRNA expression was analyzed by qRT-PCR in *plantaris* muscles from control and mutant mice before (c) and after 7 days of CH. Data (mean ± SEM) are normalized by *18S rRNA* expression and as fold-induction relative to controls (c). **p* < 0.05 versus controls (c); §*p* < 0.05 versus controls (7).

(C) *Plantaris* muscles from one leg of control and mutant mice were injected with AAV-IL6 21 days prior to muscle overloading procedure of both legs. Muscles were isolated after 7 days of CH for satellite cell proliferation and fusion analyses, and after 14 days of CH for satellite cell fusion and overall growth analyses.

(D–F) Numbers of Pax7⁺ cells per mm² (D), Pax7⁺Ki67⁺ cells per mm² (E), and myonuclei per fiber (F) were quantified in control and mutant *plantaris* muscle sections injected (+) or not (–) with AAV-IL6 after 7 days of CH. Data are mean ± SEM. **p* < 0.05 versus controls (–); §*p* < 0.05 versus mutants (–).

(G) Muscle sections immunostained for dystrophin and mean CSA (± SEM) from control and mutant muscles injected (+) or not (–) with AAV-IL6 after 14 days of CH. **p* < 0.05 versus controls (–).

compared to non-injected muscles using qRT-PCR (Figure S3A). *Il6* overexpression did not affect the numbers of Pax7⁺ and Pax7⁺Ki67⁺ proliferating satellite cells in control muscles 7 days post-CH, suggesting that the level of *Il6* in control muscles does not limit growth. Significantly, the numbers of satellite cells (Pax7⁺, Figure 4D) and proliferating satellite cells (Pax7⁺Ki67⁺, Figure 4E) increased to control levels in overloaded mutant muscles overexpressing *Il6*, indicating a functional role for decreased *Il6* expression in the altered satellite cell proliferation of mutant CH muscles. In contrast, *Il6* overexpression was

the major limiting step for hypertrophy in response to overload in *Srf*-deleted muscles.

Il4 Restores Satellite Cell Fusion and In Vivo Muscle Growth

To discern whether altered satellite cell recruitment could determine the lack of hypertrophy of *Srf*-deleted myofibers, the genes involved must be identified. *Il4* is a good candidate because 1) it has previously been shown to control fusion of myoblasts to nascent myotubes during postnatal growth (Horsley et al.,

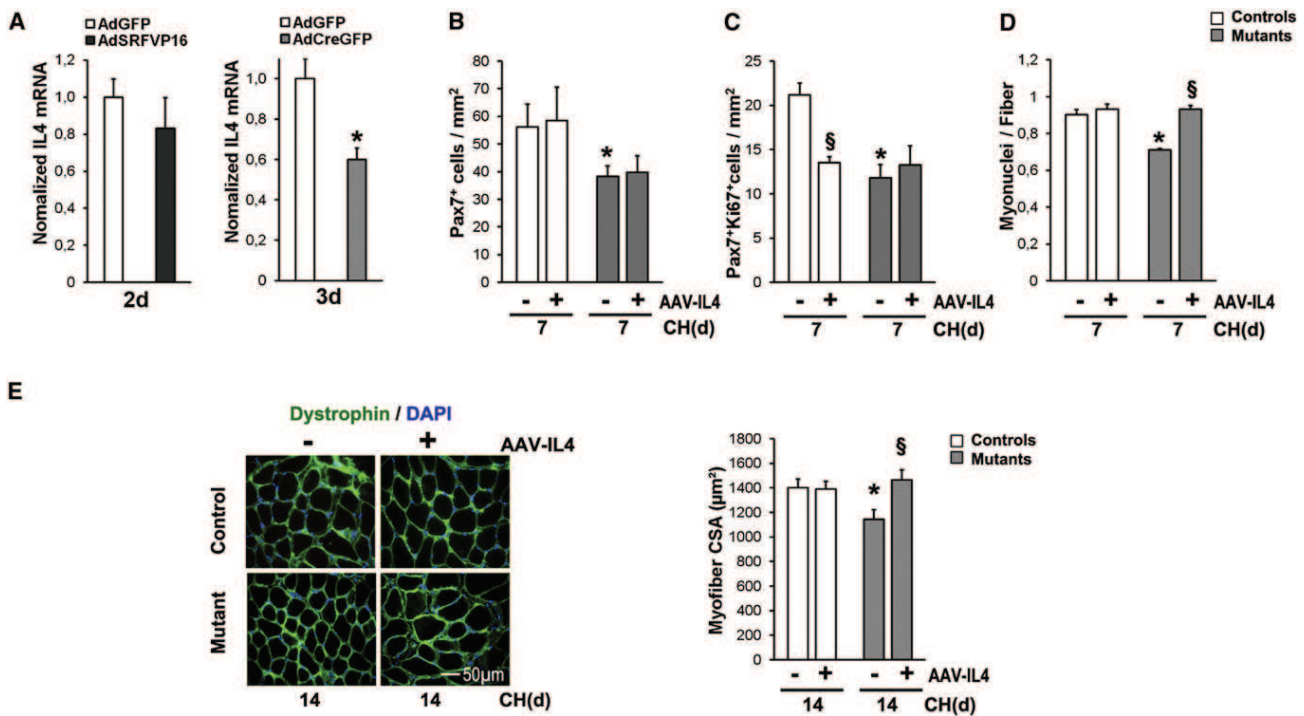


Figure 5. *Il4* Overexpression Restores Satellite Cell Fusion and Muscle Growth

(A) *Il4* mRNA expression was analyzed by qRT-PCR in myotubes (*Srf*^{flox/flox}) transduced with AdGFP or AdCreGFP for 72 hr or with AdSRFV16 for 48 hr. Data (mean ± SEM) are normalized by *cyclophilin* expression and presented as fold-induction relative to AdGFP. *p < 0.05 versus AdGFP. (B–D) Numbers of Pax7⁺ cells per mm² (B), Pax7⁺Ki67⁺ cells per mm² (C), and myonuclei per fiber (D) were quantified in control and mutant *plantaris* muscle sections injected (+) or not (–) with AAV-IL4 after 7 days of CH. Data are mean ± SEM. *p < 0.05 versus controls (–); §p < 0.05 versus mutants (–). (E) Muscle sections immunostained for dystrophin and mean CSA (± SEM) from control and mutant muscles injected (+) or not (–) with AAV-IL4 after 14 days of CH. *p < 0.05 versus controls (–); §p < 0.05 versus mutants (–).

2003) and 2) the postnatal muscle-growth defect linked to skeletal muscle-specific loss of *Srf* has been correlated to decreased *Il4* expression (Charvet et al., 2006). In primary myotubes lacking *Srf* (AdCreGFP-transduced for 3 days), *Il4* expression is reduced by 40% when compared to control myotubes (AdGFP) (Figure 5A). To determine whether decreased *Il4* expression could account for defective fusion of control myocytes to *Srf*-deleted myotubes, in vitro fusion experiments were conducted using CM issued from *Il4*^{-/-} myotubes and exogenous *Il4*. Importantly, *Il4* addition rescued fusion, whereas CM from *Il4*^{-/-} myotubes did not ameliorate fusion (Figure S4). The implication of decreased *Il4* expression in the lack of growth in *Srf*-deleted muscles was then addressed in vivo by injecting control and mutant *plantaris* muscles with an AAV driving *Il4* expression (AAV-IL4) prior to CH. A robust *Il4* overexpression was measured in *plantaris* muscle injected with AAV-IL4 (Figure S5A). When *Il4* was overexpressed in control muscles on day 7 post-CH, the number of Pax7⁺ cells was unchanged and the number of proliferating Pax7⁺Ki67⁺ satellite cells was lower, suggesting that *Il4* might drive satellite cells toward fusion and accelerate the growth process. In mutant muscles, we observed that *Il4* overexpression had no effect on the total number of Pax7⁺ or Pax7⁺Ki67⁺ satellite cells (Figures 5B and 5C). Most interestingly, the impaired fusion of satellite cells to mutant myofibers was fully rescued by *Il4* overexpression, as assessed by count-

ing myonuclei numbers 7 and 14 days post-CH (Figures 5D and S5B). Moreover, *Il4* overexpression was able to rescue the lack of response to overload in mutant muscle because mutant *plantaris* muscle was now able to grow following an overload-induced hypertrophy (Figure 5E). The 30% increase in size of mutant myofibers expressing *Il4* allowed mutant muscles to reach the size of hypertrophied control muscles.

Taken together, these data show that *Il4* is necessary for *Srf*-controlled fusion in vitro and is sufficient to rescue both the impaired satellite cell fusion of *Srf* mutant muscles and their lack of hypertrophic growth in vivo without improving the decreased proliferation of satellite cells. These results suggest that satellite cell fusion to myofibers is the main limiting step for growth occurring in myofibers lacking *Srf*. In addition, we identify *Il4* in vivo as a crucial secreted factor involved in the paracrine control of satellite cell fusion during CH.

Cox2 Is a Direct *Srf* Target Gene and Controls *Il4* Expression

Whether *Il4* could be a direct target gene of *Srf*, as found in the muscle cell line C2C12 (Charvet et al., 2006), was further investigated through ChIP experiments. In contrast to the results in C2C12 cells, none of the putative CAzG boxes of *Il4* promoter bound *Srf* protein in cultured primary myotubes (Figure S6A). However, *Srf* was bound to α -skeletal actin and *myl9* promoters,

indicating the efficacy of the assay. This discrepancy could be attributed to the different cellular systems used in this study. To further examine the potential control of *Ilf4* transcription by Srf, various *Ilf4* promoter-reporter constructs were created and the luciferase activity in the presence or absence of activated Srf (SRFVP16) was analyzed. SRFVP16 only marginally activated pIL4(-1670) reporter construct, which contains two of the putative Srf binding sites, and pIL4(-838) reporter, which lacks putative CArG boxes (Figure S6B). In line with these results, endogenous *Ilf4* expression was not modulated in gain-of-function myotube samples in a short time point post-AdSRFVP16 transduction (2 days) which favors the regulation of direct Srf target genes rather than secondary targets (Figure 5A). Taken together, these data argue against a direct regulation of *Ilf4* by Srf in primary myotubes.

We looked for potential candidate genes whose expression could be directly regulated by Srf and potentially linked to *Ilf4* expression in the list of genes upregulated upon Srf activation (Table S1). Attention was focused on the *Cox2* gene, whose activity has been reported to be required for skeletal muscle hypertrophy (Novak et al., 2009). A common signaling pathway, the calcineurin/NFAT pathway, has previously been implicated in the control of fusion by Cox-derived prostaglandins and in the regulation of *Ilf4* expression in muscle cells (Horsley et al., 2003; Horsley and Pavlath, 2003). We first confirmed by qRT-PCR that *Cox2* expression is greatly increased in myotubes transduced with AdSRFVP16, whereas a significant decrease of *Cox2* expression in myotubes lacking Srf was observed (Figure 6A). Interestingly, an increase of *Cox2* expression in control muscles, which was significantly blunted in *Srf*-deleted muscles, was observed 7 days post-CH (Figure 6B), thus reinforcing the potential role of *Cox2* in Srf-dependent growth. To decipher whether *Cox2* could be a direct target of Srf, *Cox2* reporter plasmids were constructed and we showed that SRFVP16 increased the activation of pCox2(-2570) reporter by 3.5-fold. In contrast, the pCox2(-2250) reporter was activated significantly less, suggesting the presence of a Srf-responding region in the portion -2570 to -2250 of the *Cox2* promoter (Figure 6C), which contains a putative CArG motif at position -2320. In ChIP experiments performed in primary myotubes, the *Cox2* promoter covering position -2320 was robustly amplified from Srf immunoprecipitates compared to IgG controls, demonstrating Srf binding (Figure 6D). Together, these results suggest that *Cox2* expression is directly regulated by Srf through binding to a CArG motif at position -2320 of the *Cox2* promoter.

To gain insight into the possible regulation of *Ilf4* expression by *Cox2*, primary myotubes were treated with a specific *Cox2*-inhibitor (SC-791) and *Ilf4* transcripts were quantified. *Cox2* inhibition led to a 40% decrease of *Ilf4* expression in a dose-response manner (Figure 6E). This effect seemed to be specific to *Ilf4* because *Ilf6* and *Srf* expression levels were unaffected under the same conditions (data not shown). More importantly, in transfection experiments, *Cox2* overexpression was able to increase the activation of the pIL4(-1730) reporter more than 5-fold (Figure 6F). In addition, both treatments with cyclosporin (CsA), a potent inhibitor of calcineurin, and coexpression of VIVIT, a NFAT inhibitory peptide, significantly decreased *Cox2*-induced activation of the pIL4(-1730) reporter, showing that at least part of this activation is dependent upon the

calcineurin/NFAT pathway (Figure 6F). To investigate whether *Cox2* could regulate *Ilf4* expression in vivo, AAV driving *Cox2* expression (AAV-*Cox2*) was injected in *plantaris* muscle. AAV-*Cox2* injection strongly increased *Cox2* expression (Figure S7A). Post-CH, the overexpression of *Cox2* increased by 4.5-fold the amount of endogenous *Ilf4* transcripts, whereas *Ilf6* transcript levels were unaffected (Figure 6G). Overall, these data suggest that *Cox2* positively regulates *Ilf4* gene transcription in skeletal muscle.

Cox2 Rescues Satellite Cell Fusion and Overall Muscle Growth

If direct control of *Cox2* expression by Srf mediates muscle growth through *Ilf4*, it is expected that *Cox2* overexpression in vivo will rescue *Srf*-deleted myofiber growth in a similar manner to *Ilf4*. Therefore, control and mutant *plantaris* muscles were injected with AAV-*Cox2* prior to CH. *Cox2* overexpression had no effect on satellite cell proliferation and fusion in control muscles. Significantly, after overload-induced hypertrophy of mutant muscles, *Cox2* overexpression did not influence the number of proliferating satellite cells (Figures 7A and 7B) but still effectively rescued to control levels in both satellite cell fusion (Figure 7C and S7B) and overall growth of *Srf*-deleted myofibers. Indeed, mean CSA of mutant *plantaris* muscles injected with AAV-*Cox2* was comparable to control muscles (Figure 7D) and, thus, display a rescue of growth similar to that obtained by *Ilf4* overexpression (Figure 5E).

These data show a previously unknown Srf-dependent paracrine control of muscle growth by *Cox2/Ilf4* within myofibers.

DISCUSSION

Taking advantage of a genetic model that allows the invalidation of *Srf* in myofibers and not in satellite cells, we demonstrate that the recruitment of satellite cells to the myofibers is a limiting step for physiological hypertrophy in adult *Srf*-deleted muscles. We provide evidence for a gene network operating in myofibers during overload-induced muscle growth in which Srf modulates *Ilf6* and *Cox2/Ilf4* expression levels, which control satellite cell proliferation and fusion, respectively. We propose that, within overloaded myofibers, Srf acts as a sensor for mechanical cues that translates them into paracrine signals, which in turn regulate satellite cell functions and support muscle growth (Figure 7E).

Two nonexclusive mechanisms are involved in muscle growth: 1) the increase of net protein content through the activation of Akt/TOR pathway and 2) the addition of satellite cell-derived myonuclei to the adult myofiber. Our data show that the lack of recruitment of satellite cells is responsible for the absence of compensatory hypertrophy in *Srf*-deleted muscles. Indeed, an absence of *Srf* does not compromise Akt signaling and Srf is dispensable for Akt-driven muscle growth that does not involve satellite cells. Using in vivo and in vitro experiments, we further deciphered the Srf-dependent molecular and cellular events that could be implicated in overload-induced hypertrophy. Our data show that, in response to overload, Srf within myofibers controls both satellite cell proliferation and fusion in a paracrine manner. Srf promotes the production of extracellular factors (*Ilf6* and *Ilf4*) by the myofiber and, thus, controls the satellite cell local

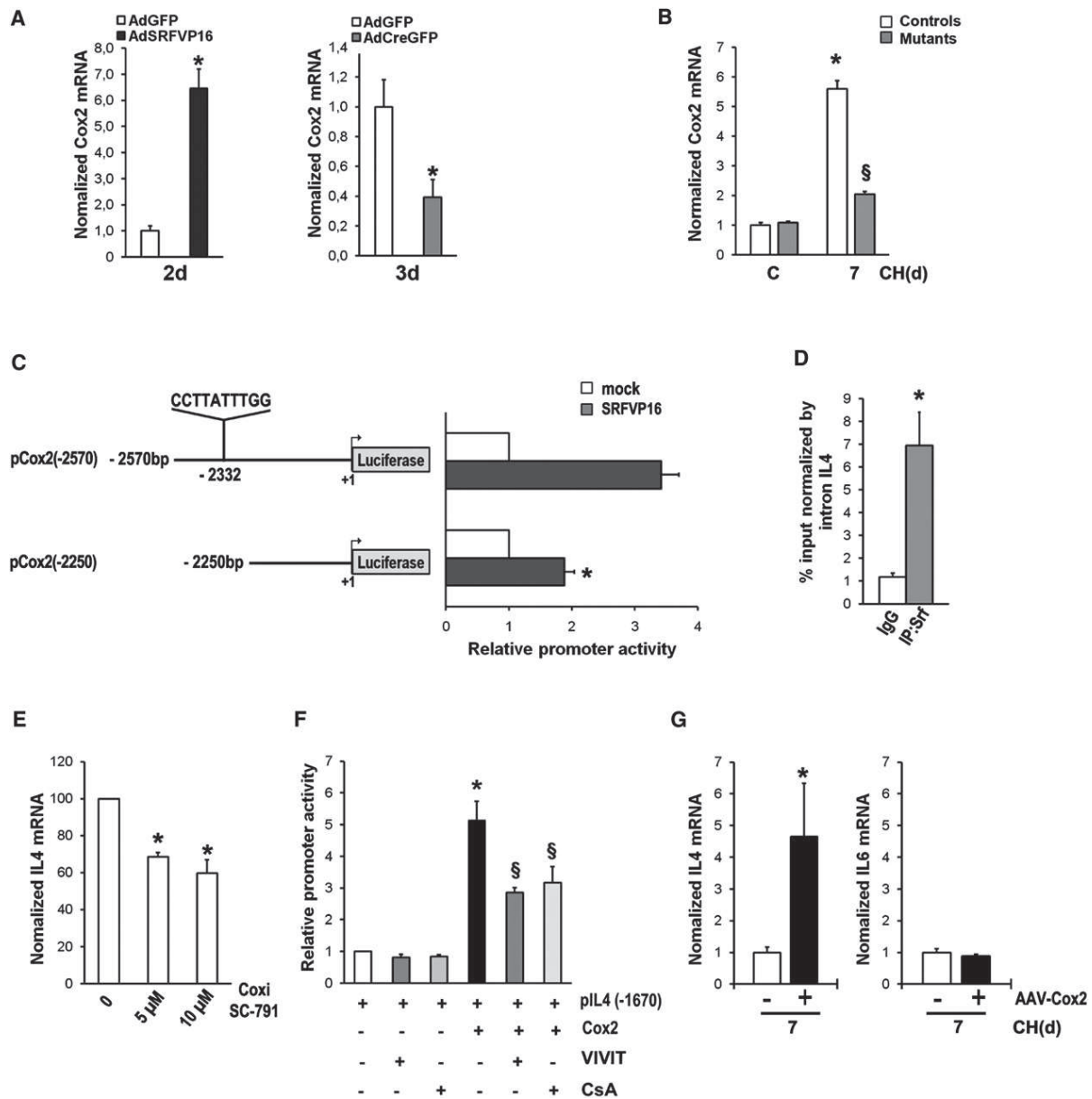


Figure 6. Cox2 Is a Direct Target of Srf and Controls Il4 Expression

(A) *Cox2* mRNA expression was analyzed by qRT-PCR in myotubes (*Srf*^{fllox/fllox}) transduced with AdGFP or AdCreGFP for 72 hr or with AdSRFVP16 for 48 hr. Data (mean ± SEM) are normalized by *cyclophilin* expression and presented as fold-induction relative to AdGFP. *p < 0.05 versus AdGFP.

(B) *Cox2* mRNA expression was analyzed by qRT-PCR in *plantaris* muscles from control and mutant mice before (c) and after 7 days of CH. Data (mean ± SEM) are normalized by *18S rRNA* expression and as fold-induction relative to controls (c). *p < 0.05 versus controls (c); §p < 0.05 versus controls (7).

(C) Deletion analysis of *Cox2* promoter fragments ranging from -2570 to +1, cloned in front of a luciferase reporter and cotransfected with SRFVP16. Putative CARG box is indicated. Shown is the mean of relative luciferase activity (± SEM) normalized to Renilla luciferase. *p < 0.05 versus pCox2(-2570) SRFVP16.

(D) ChIP performed using myotubes and antibodies specific to Srf or IgG. Bound *Cox2* promoter was amplified by qRT-PCR and normalized to input and to an additional negative control (primers spanning the first intron of *Il4*). Data are mean ± SEM. *p < 0.05 versus IgG.

(E) *Cox2* mRNA expression was analyzed by qRT-PCR in myotubes (*Srf*^{fllox/fllox}) treated with *Cox2* inhibitor (SC-791) for 48 hr. Data (mean ± SEM) are normalized by *cyclophilin* expression and as fold-induction relative to untreated. *p < 0.05 versus (0).

(F) Responsiveness of pIL4(-1670) luciferase reporter construct to *Cox2* treated with calcineurin inhibitor (CsA) or cotransfected with a NFAT inhibitor (VIVIT). Data are mean ± SEM. *p < 0.05 versus pIL4(-1670) alone, §p < 0.05 versus pIL4(-1670) plus *Cox2*.

(G) *Il4* and *Il6* mRNA expressions were analyzed by qRT-PCR in control *plantaris* muscles injected (+) or not (-) with AAV-Cox2 after 7 days of CH. Data (mean ± SEM) are normalized by *cyclophilin* expression and as fold-induction relative to (-). *p < 0.05 versus (-).

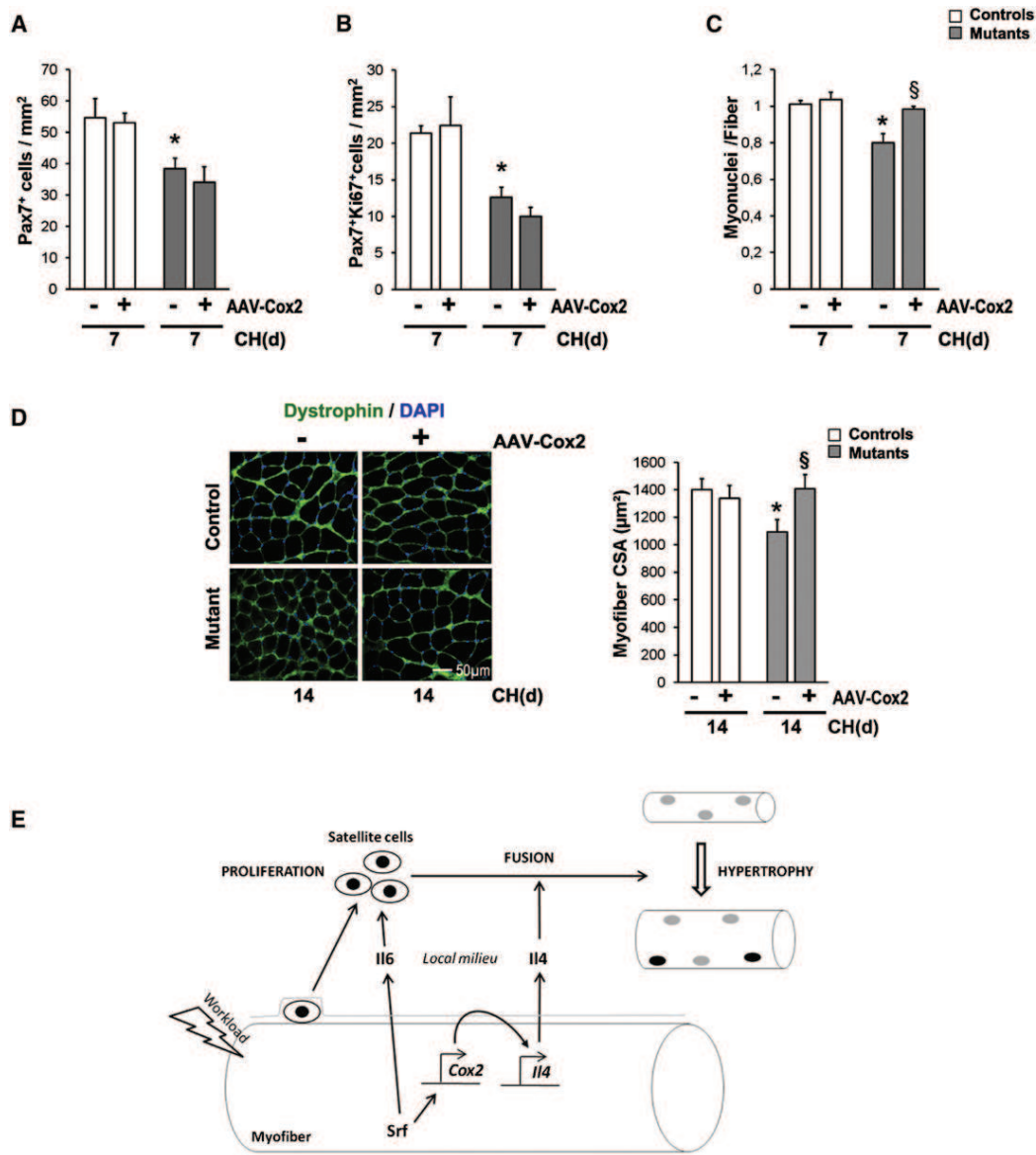


Figure 7. Cox2 Recues Satellite Cell Fusion and Muscle Growth

(A–C) Numbers of Pax7⁺ cells per mm² (A), Pax7⁺Ki67⁺ cells per mm² (B) and myonuclei per fiber (C) were quantified in control and mutant *p/antaris* muscle sections injected (+) or not (–) with AAV-Cox2 after 7 days of CH. Data are mean ± SEM. *p < 0.05 versus controls (–); §p < 0.05 versus mutants (–).

(D) Muscle sections immunostained for dystrophin and mean CSA (± SEM) from control and mutant muscles injected (+) or not (–) with AAV-Cox2 after 14 days of CH. *p < 0.05 versus controls (–); §p < 0.05 versus mutants (–).

(E) Schematic model: in response to increased workload, Srf within myofibers modulates *Il6* and *Cox2/Il4* expressions and, therefore, exerts a paracrine control of satellite cell proliferation and fusion, respectively, which in turn support skeletal muscle hypertrophy.

milieu in conditions of disturbed muscle homeostasis. Thus, coordinated regulation by Srf of both satellite cell proliferation and fusion ensures proper muscle growth in response to increased load. We verified that Il6 and Il4 do not stimulate the hypertrophy of fully differentiated myotubes in an autocrine manner because myotubes treated with Il6 or Il4 did not display an increase in size (data not shown).

It is notable that reduced proliferation of satellite cells is not the limiting step responsible for the lack of hypertrophy of muscles deleted for *Srf* because the normalization of satellite cell prolifer-

ation by *Il6* overexpression did not improve satellite cell fusion and was unable to drive muscle hypertrophy. In contrast, the restoration of satellite cell fusion by either *Il4* or *Cox2* overexpression was sufficient to rescue overload-induced growth of muscles lacking *Srf*. Interestingly, this rescue was obtained without any increase in satellite cell proliferation, showing that satellite cell fusion was the major limiting cellular event. The number of cycling satellite cells remaining in *Srf*-deleted muscles (50%) was probably sufficient to support growth when fusion is restored. This situation differs from that reported for *Il6*^{-/-}

mice, in which reduced muscle compensatory hypertrophy was attributed mainly to a defect in satellite cell proliferation (Serrano et al., 2008). In that case, satellite cell proliferation was more profoundly affected (with only 30% of cycling satellite cells left) than muscles lacking Srf. Our data support an important role for satellite cell recruitment in activity-induced hypertrophy of Srf-deleted muscles and are in line with a recent study showing that increased fiber size during compensatory hypertrophy is preceded by the addition of nuclei and that this constitutes the major cause of hypertrophy (Bruusgaard et al., 2010). Interestingly, overload-induced muscle hypertrophy can still take place in the absence of satellite cells (McCarthy et al., 2011). The compensatory mechanism allowing growth in satellite cell-depleted skeletal muscle may be impaired in our model due to the lack of Srf expression in myofibers.

While searching for mechanisms underlying such defects in satellite cell recruitment, the Srf gain of function transcriptome study led us to focus our interest on the *Cox2* gene. Here, we show that *Cox2* expression increases strongly in response to muscle overload in a Srf-dependent manner, and also show that *Cox2* is a direct target gene of Srf in differentiated muscle cells. Significantly, the sole restoration of *Cox2* expression in myofibers lacking Srf was able to rescue satellite cell recruitment to the growing fiber and to subsequent muscle growth. This study constitutes the first in vivo demonstration of the specific implication of *Cox2* activity within the myofiber for the control of satellite cell fusion during overload-induced hypertrophy. Interestingly, *Cox2* activity has been shown to be required for efficient muscle regeneration (Bondesen et al., 2004; Shen et al., 2006), recovery from atrophy (Bondesen et al., 2006), and overload-induced hypertrophy (Novak et al., 2009). However, in this last case, the blunting of muscle growth by a specific *Cox2* inhibitor was attributed to reduction of macrophage accumulation, extracellular protease activity, and overall cell proliferation. The effect on proliferation was relatively modest and did not discriminate satellite cells from other cell types. In our experimental procedure of hypertrophy, inflammation did not appear to be differentially modulated between mutant and control muscles as assessed by quantifying macrophage-specific genes expression levels and F4/80 positive cells on muscle sections (data not shown). Moreover, our present data argue against paracrine control of satellite cell proliferation by *Cox2* during hypertrophy because *Cox2* overexpression in Srf-deleted myofibers failed to rescue satellite cell proliferation.

How could a Srf-dependent increase of *Cox2* expression in myofibers control satellite cell fusion during overload? We propose that *Cox2* and *Il4* genes are linked. Here, we show for the first time the implication of *Il4* during overload-induced muscle hypertrophy. As for *Cox2*, in vivo overexpression of *Il4* in Srf-deleted myofibers was sufficient to restore satellite cell fusion and muscle growth. However, in contrast to *Cox2*, *Il4* does not appear to be a direct target gene of Srf in myotubes derived from primary cultures. Significantly, our data clearly demonstrate that *Cox2* controls *Il4* expression. Indeed, inhibition of *Cox2* activity downregulates endogenous *Il4* expression in cultured myotubes, whereas *Cox2* overexpression activates the *Il4* promoter. Moreover, AAV-driven *Cox2* overexpression was sufficient to increase the amount of endogenous *Il4* transcripts in vivo. These data constitute the first report showing

the upregulation of *Il4* expression by *Cox2* in muscle cells. Thus, *Il4* could mediate at least some of the action of *Cox2* on satellite cell recruitment during muscle overload. Furthermore, we show that the calcineurin/NFAT pathway relays in part the increase of *Il4* expression by *Cox2* activity. Because *Cox2*-derived prostaglandin PGF_{2a} has been shown to control myoblast fusion with nascent myotubes in a NFATc2-dependent manner (Horsley and Pavlath, 2003) and *Il4* expression has been shown to be controlled by NFATc2 (Horsley et al., 2003), NFATc2 could be the transcription factor that links *Cox2* to *Il4* activation.

The adaptation of skeletal muscle to external mechanical stress, such as increased loading, requires initial sensing of the stress by myofibers, followed by its transduction into signals that will generate the appropriate physiological response. We show that, within myofibers, Srf is required for muscle growth in response to increased loading but is dispensable for Myr-Akt-induced muscle hypertrophy, which occurs in the absence of increased mechanical signals. Another difference between these two growth models is that only overload-induced hypertrophy relies on the recruitment of satellite cells. Therefore, it appears that Srf may be a central transcription factor required for the translation of mechanical signals into a myofiber transcriptional program leading to local milieu modifications that are interpreted by satellite cells and support muscle growth. Several observations support the role of Srf as a sensor of mechanical cues. In cardiac muscle cells, the nuclear localization of the Srf cofactor Mrtf-A is induced by mechanical stretch and *Mrtf-A*^{-/-} mice show significantly attenuated mechanical stress-induced cardiac hypertrophy (Kuwahara et al., 2010). In human skeletal muscle, *STARS* (an activator of Srf by increasing actin polymerization), *MRTFs*, and *SRF* expressions are upregulated following resistance training-induced hypertrophy (Lamon et al., 2009), and *Stars* expression level is increased during overload-induced muscle hypertrophy in mice (data not shown). Collectively, these observations point to the Rho-actin-Mrtf-Srf pathway as a signaling mechanism mediating mechanical stress-induced gene expression and hypertrophic responses.

In this study, we show that, within myofibers, Srf is a key regulator of skeletal muscle hypertrophy in response to workload by enhancing satellite cell proliferation and their subsequent fusion to the growing fibers in a paracrine fashion through *Il6* and *Cox2/Il4*, respectively. Interestingly, hypertrophy induced by overload is greatly attenuated in older animals (Alway et al., 2002; Carson et al., 1995). We previously reported a decreased expression of Srf in aged human and mouse muscles. Accordingly, loss of Srf within myofibers of young adult mice induced premature aging in skeletal muscle (Lahoute et al., 2008). Therefore, during aging, there is a further link between Srf activity and muscle hypertrophic capacities. Thus, the identification of Srf as a master controller of physiological hypertrophy carries potential significance in the search for muscle atrophy therapies and treatments alleviating muscle aging.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Mouse Protocols

Mice homozygous for Srf floxed alleles (*Srf*^{flox/flox}) and HSA-Cre-ER^{T2}. *Srf*^{flox/flox} tamoxifen-dependent Cre recombinase prenatant mice have been

previously described (Lahoute et al., 2008). In all experiments, 2-month-old pre-mutant and $Srf^{flox/flox}$ female mice were given intraperitoneal tamoxifen (1 mg per day; Sigma) injections for 5 consecutive days and are referred as mutants and controls, respectively.

Compensatory hypertrophy (CH) of *plantaris* muscles was induced as described (Serrano et al., 2008). During the process of CH, control and mutant mice were injected with tamoxifen every 3 days. A minimum of four animals of each genotype were analyzed for every experiment. Control and mutant *plantaris* muscles were injected with 7×10^{10} viral AAV genomes. Mice were given a 3-week recovery period, allowing the expression of the transgene before performing CH.

For electroporation, *tibialis* muscles were injected with 8 U of hyaluronidase 1 hr prior injection of 15 μ g pMyr-Akt or 5 μ g pH2B-CFP+10 μ g pCDNA3 plasmids. Six 65 V/cm pulses of 60 ms, with a 100-ms interval, were applied. Muscles were collected 10 days after gene delivery.

All experiments were conducted in accordance with European guidelines for the care and use of laboratory animals and were approved by the institutional animal care and use committee.

Plasmids and Viral Productions

For detailed plasmid and viral productions descriptions, see Supplemental Information.

Primary Muscle Cell Culture and Infections

Primary cultures were derived from hindlimb muscles of $Srf^{flox/flox}$ mice and cultured as described (Ohanna et al., 2005). Myoblasts were grown in growth medium (DMEM/F12, 2% Ultrosor G, 20% Fetal Calf Serum). For differentiation, myoblasts were seeded in Matrigel-coated dishes and cultured in differentiation medium (DM; DMEM/F-12, 2% horse serum).

Myotubes at day 2 of differentiation were transduced with 2 i.p./cell of adenoviruses AdGFP, AdCreGFP, or AdSRFVP16.

Myotubes were treated with Cox2-inhibitor II (SC-791, Calbiochem; 5 and 15 μ M) or cyclosporine (Csa, Sigma, 5 μ M), added daily to DM.

To generate a stable cell line expressing nls-LacZ, myoblasts were infected twice with the supernatant of a stable 293 Phoenix cell line producing nls-LacZ retrovirus and 8 μ g/ml of polybrene.

Single-Fiber Culture

Individual fibers were isolated from EDL muscles as described (Rosenblatt et al., 1995). Myofibers were grown as nonadherent cultures for 48 hr in DMEM medium supplemented with 2% horse serum or in conditioned media from control myotubes.

To detect cycling satellite cells, single myofibers were immunostained using anti-Pax7 (Santa Cruz) and anti-Ki67 (Abcam) and counterstained with DAPI. The % of Pax7⁺Ki67⁺ cells is represented as relative to the total number of Pax7⁺ cells. At least 60 cells were counted for each assay.

Fusion and Proliferation Assays

To analyze fusion, myotubes at day 2 of differentiation transduced with AdCreGFP or AdGFP were loaded with 6 μ M of Green Cell Tracker (Molecular Probes) for 15 min and then were cocultured with nls-LacZ myocytes (myoblasts incubated overnight in DM). When indicated, conditioned media (CM) from control myotubes was added. Two days later, fusion events were scored after immunostaining with anti-LacZ antibody (Invitrogen) by counting the dual-labeled cells (green cells GFP⁺/nls-lacZ⁺). The number of fusion events was normalized by the number of stained nls-LacZ nuclei. The presence of dual labels was analyzed in 70–150 myotubes in each experiment.

To detect S phase entry, $Srf^{flox/flox}$ myoblasts were cultured for 12 hr in CM from SRF^{flox/flox} myotubes transduced with AdCreGFP or AdGFP supplemented with 10% FCS, 0.1% Ultrosor and pulsed with BrdU (Sigma; 5 mg/ml) for 2 hr prior to fixation and subsequent immunostaining using anti-BrdU antibody (Dako). The percentage of BrdU⁺ cells is represented as relative to total number of cells counted. At least 1,000 cells were counted for each assay.

Isolation of mRNA, RT-PCR, and qRT-PCR

Total RNA was extracted using TRIzol reagent and reverse-transcribed with VIL0 reverse transcriptase (Invitrogen). Quantitative PCR analysis was per-

formed using a Light Cycler instrument with SYBR Green I kit (Roche). Primer sequences are listed in Supplemental Information. The values were normalized to housekeeping genes *18S rRNA* or *Cyclophilin*.

ChIPs

Myotubes (5.10⁶ cells) were fixed with 1% paraformaldehyde for 11 min. For each immunoprecipitation, sonicated chromatin was incubated with 3 μ g anti-Srf (G20, Santa Cruz) or IgG and immunocomplexes were recovered using a Magna ChIP G Kit (Millipore). Quantification of immunoprecipitated DNA was done by real-time PCR using the appropriated primers (see Supplemental Information) and reported to input chromatin. Results shown are normalized to the recovery of a non-Srf-regulated gene region (in the intronic part of *Il4*).

Reporter Assays

Fifty thousand myoblasts were transfected using Lipofectamine 2000 reagent (Invitrogen) with 80 ng luciferase plasmid reporter, 100 ng pRL-TK and 200–400 ng of indicated plasmid in a total of 800 ng DNA. Twenty-four hours post-transfection, cells were cultured in DM and harvested 24 hr later. Firefly and *Renilla* luciferase activities were determined using the Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega). Each experiment was performed in triplicate and repeated three times.

Immunostaining

Plantaris muscles were frozen in cooled isopentane and cut in 7 μ m-thick sections. Fiber size, myonuclei number, and satellite cells were analyzed by immunostaining using anti-dystrophin (Novocastra), anti-P-Akt (Cell Signaling), anti-Pax7 (Santa Cruz), and/or anti-Ki67 (Abcam) and DAPI staining. Between 300 and 600 myofibers were analyzed per muscle. The distribution of fiber cross-sectional area was determined using Metamorph.

Western Blot Analysis

Western blotting was performed as described (Lahoute et al., 2008). Immunoblots were done using anti-phospho-Akt Ser473 and anti-Akt (Cell Signaling), anti-Srf, and anti-Gapdh (Santa Cruz) antibodies.

Statistical Analysis

The significance of differences between means was assessed with a Student's t-test. P values of < 0.05 were considered statistically significant.

SUPPLEMENTAL INFORMATION

Supplemental Information includes Supplemental Experimental Procedures, seven figures, and one table and appears with this article online at doi:10.1016/j.cmet.2011.12.001.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank R. Treisman, M. Foretz, G. Pavlath and A.S. Armand for providing materials. We acknowledge the Genomic Core Facility of Cochin Institute. We are grateful to L. Dandolo, B. Chazaud, R. Mounier, C. Desdouets, S. Alonso-Martin, J.P. Concordet, P. Maire, F. Legrand, and members of the laboratory for assistance and critical reading of the manuscript. Figure 4 was produced using Servier Medical Art. This work was supported by grants from AFM (13523 to A.S.) and from ANR (JC08-327703 to A.G. and A.S.; and ANR-08-GENO-023 to S.H., D.D., A.S.).

Received: March 3, 2011

Revised: July 20, 2011

Accepted: December 2, 2011

Published online: January 3, 2012

REFERENCES

Alway, S.E., Degens, H., Krishnamurthy, G., and Smith, C.A. (2002). Potential role for Id myogenic repressors in apoptosis and attenuation of hypertrophy in muscles of aged rats. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 283, C66–C76.

- Blaauw, B., Canato, M., Agatea, L., Toniolo, L., Mammucari, C., Masiero, E., Abraham, R., Sandri, M., Schiaffino, S., and Reggiani, C. (2009). Inducible activation of Akt increases skeletal muscle mass and force without satellite cell activation. *FASEB J.* *23*, 3896–3905.
- Bondesen, B.A., Mills, S.T., Kegley, K.M., and Pavlath, G.K. (2004). The COX-2 pathway is essential during early stages of skeletal muscle regeneration. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* *287*, C475–C483.
- Bondesen, B.A., Mills, S.T., and Pavlath, G.K. (2006). The COX-2 pathway regulates growth of atrophied muscle via multiple mechanisms. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* *290*, C1651–C1659.
- Bondesen, B.A., Jones, K.A., Glasgow, W.C., and Pavlath, G.K. (2007). Inhibition of myoblast migration by prostacyclin is associated with enhanced cell fusion. *FASEB J.* *21*, 3338–3345.
- Bruusgaard, J.C., Johansen, I.B., Egner, I.M., Rana, Z.A., and Gundersen, K. (2010). Myonuclei acquired by overload exercise precede hypertrophy and are not lost on detraining. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *107*, 15111–15116.
- Carson, J.A., Yamaguchi, M., and Alway, S.E. (1995). Hypertrophy and proliferation of skeletal muscle fibers from aged quail. *J. Appl. Physiol.* *78*, 293–299.
- Carson, J.A., Nettleton, D., and Reecy, J.M. (2002). Differential gene expression in the rat soleus muscle during early work overload-induced hypertrophy. *FASEB J.* *16*, 207–209.
- Charvet, C., Houbron, C., Parlakian, A., Giordani, J., Lahoute, C., Bertrand, A., Sotiropoulos, A., Renou, L., Schmitt, A., Melki, J., et al. (2006). New role for serum response factor in postnatal skeletal muscle growth and regeneration via the interleukin 4 and insulin-like growth factor 1 pathways. *Mol. Cell Biol.* *26*, 6664–6674.
- Flück, M., Carson, J.A., Schwartz, R.J., and Booth, F.W. (1999). SRF protein is upregulated during stretch-induced hypertrophy of rooster ALD muscle. *J. Appl. Physiol.* *86*, 1793–1799.
- Glass, D.J. (2010). Signaling pathways perturbing muscle mass. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* *13*, 225–229.
- Horsley, V., and Pavlath, G.K. (2003). Prostaglandin F2(alpha) stimulates growth of skeletal muscle cells via an NFATC2-dependent pathway. *J. Cell Biol.* *161*, 111–118.
- Horsley, V., Jansen, K.M., Mills, S.T., and Pavlath, G.K. (2003). IL-4 acts as a myoblast recruitment factor during mammalian muscle growth. *Cell* *113*, 483–494.
- Kuang, S., Gillespie, M.A., and Rudnicki, M.A. (2008). Niche regulation of muscle satellite cell self-renewal and differentiation. *Cell Stem Cell* *2*, 22–31.
- Kuwahara, K., Kinoshita, H., Kuwabara, Y., Nakagawa, Y., Usami, S., Minami, T., Yamada, Y., Fujiwara, M., and Nakao, K. (2010). Myocardin-related transcription factor A is a common mediator of mechanical stress- and neuro-humoral stimulation-induced cardiac hypertrophic signaling leading to activation of brain natriuretic peptide gene expression. *Mol. Cell Biol.* *30*, 4134–4148.
- Lafreniere, J.F., Mills, P., Bouchentouf, M., and Tremblay, J.P. (2006). Interleukin-4 improves the migration of human myogenic precursor cells in vitro and in vivo. *Exp. Cell Res.* *312*, 1127–1141.
- Lahoute, C., Sotiropoulos, A., Favier, M., Guillet-Deniau, I., Charvet, C., Ferry, A., Butler-Browne, G., Metzger, D., Tuil, D., and Daegelen, D. (2008). Premature aging in skeletal muscle lacking serum response factor. *PLoS ONE* *3*, e3910.
- Lamon, S., Wallace, M.A., Léger, B., and Russell, A.P. (2009). Regulation of STARS and its downstream targets suggest a novel pathway involved in human skeletal muscle hypertrophy and atrophy. *J. Physiol.* *587*, 1795–1803.
- Le Grand, F., and Rudnicki, M.A. (2007). Skeletal muscle satellite cells and adult myogenesis. *Curr. Opin. Cell Biol.* *19*, 628–633.
- Li, J., Zhu, X., Chen, M., Cheng, L., Zhou, D., Lu, M.M., Du, K., Epstein, J.A., and Parmacek, M.S. (2005). Myocardin-related transcription factor B is required in cardiac neural crest for smooth muscle differentiation and cardiovascular development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *102*, 8916–8921.
- McCarthy, J.J., Mula, J., Miyazaki, M., Erfani, R., Garrison, K., Farooqui, A.B., Srikuea, R., Lawson, B.A., Grimes, B., Keller, C., et al. (2011). Effective fiber hypertrophy in satellite cell-depleted skeletal muscle. *Development* *138*, 3657–3666.
- Miralles, F., Posern, G., Zaromytidou, A.I., and Treisman, R. (2003). Actin dynamics control SRF activity by regulation of its coactivator MAL. *Cell* *113*, 329–342.
- Novak, M.L., Billich, W., Smith, S.M., Sukhija, K.B., McLoughlin, T.J., Hornberger, T.A., and Koh, T.J. (2009). COX-2 inhibitor reduces skeletal muscle hypertrophy in mice. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* *296*, R1132–R1139.
- Ohanna, M., Sobering, A.K., Lapointe, T., Lorenzo, L., Praud, C., Petroulakis, E., Sonenberg, N., Kelly, P.A., Sotiropoulos, A., and Pende, M. (2005). Atrophy of S6K1(-/-) skeletal muscle cells reveals distinct mTOR effectors for cell cycle and size control. *Nat. Cell Biol.* *7*, 286–294.
- Otis, J.S., Burkholder, T.J., and Pavlath, G.K. (2005). Stretch-induced myoblast proliferation is dependent on the COX2 pathway. *Exp. Cell Res.* *310*, 417–425.
- Parlakian, A., Charvet, C., Escoubet, B., Mericskay, M., Molkenin, J.D., Gary-Bobo, G., De Windt, L.J., Ludosky, M.A., Paulin, D., Daegelen, D., et al. (2005). Temporally controlled onset of dilated cardiomyopathy through disruption of the SRF gene in adult heart. *Circulation* *112*, 2930–2939.
- Penkowa, M., Keller, C., Keller, P., Jauffred, S., and Pedersen, B.K. (2003). Immunohistochemical detection of interleukin-6 in human skeletal muscle fibers following exercise. *FASEB J.* *17*, 2166–2168.
- Pipes, G.C., Creemers, E.E., and Olson, E.N. (2006). The myocardin family of transcriptional coactivators: versatile regulators of cell growth, migration, and myogenesis. *Genes Dev.* *20*, 1545–1556.
- Rosenblatt, J.D., Lunt, A.I., Parry, D.J., and Partridge, T.A. (1995). Culturing satellite cells from living single muscle fiber explants. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* *31*, 773–779.
- Serrano, A.L., Baeza-Raja, B., Perdiguero, E., Jardí, M., and Muñoz-Cánoves, P. (2008). Interleukin-6 is an essential regulator of satellite cell-mediated skeletal muscle hypertrophy. *Cell Metab.* *7*, 33–44.
- Shen, W., Prisk, V., Li, Y., Foster, W., and Huard, J. (2006). Inhibited skeletal muscle healing in cyclooxygenase-2 gene-deficient mice: the role of PGE2 and PGF2alpha. *J. Appl. Physiol.* *101*, 1215–1221.

Rôle du facteur de transcription Srf au cours de l'atrophie du muscle squelettique et dans les cellules satellites

Le muscle squelettique adulte est un tissu possédant la capacité fondamentale d'adapter sa taille à la demande fonctionnelle : il peut s'atrophier ou s'hypertrophier en réponse à une variation de la charge mécanique qui lui est appliquée. A l'heure actuelle, les facteurs impliqués dans la plasticité musculaire demeurent méconnus.

D'une part, grâce à différents modèles d'atrophie musculaire, nous démontrons que le facteur de transcription Srf joue le rôle de médiateur de la mécano-transduction par la voie actine/Mrtfs/Srf. L'arrêt de l'activité mécanique provoque une accumulation nucléaire d'actine monomérique, une délocalisation de Mrtf-A, coactivateur de Srf, et une diminution de l'activité de Srf, se traduisant notamment par une baisse de la transcription Srf-dépendante. Les gènes cibles de Srf comptant un grand nombre de protéines sarcomériques, telles que l' α -actine squelettique, la réduction de leur expression pourrait participer à l'atrophie musculaire. De plus, nos travaux suggèrent que la diminution de l'activité de Srf pourrait influencer l'organisation du réseau mitochondrial et le flux autophagique par des mécanismes qui restent à élucider.

D'autre part, en tirant parti d'un modèle d'invalidation conditionnelle et inductible de Srf dans les cellules satellites, nous montrons que le phénomène d'hypertrophie compensatoire requiert l'expression de *Srf* par les cellules satellites. L'absence de Srf n'altère ni la prolifération ni l'entrée en différenciation des myoblastes, néanmoins elle provoque un défaut de fusion des myoblastes aux fibres au cours de l'hypertrophie induite par surcharge.

Ainsi, nos travaux démontrent que Srf est un acteur majeur de la plasticité musculaire, à la fois en tant que médiateur de la mécano-transduction par la voie actine/Mrtfs/Srf et par son implication dans la fusion des cellules satellites aux fibres musculaires, nécessaire à l'hypertrophie compensatoire.

Mots-clefs: atrophie musculaire, cellule satellite, mécano-transduction, muscle squelettique, Srf.

Role of the transcription factor Srf during skeletal muscle atrophy and in satellite cells

Adult skeletal muscle is able to adapt its size to functional demand. It can undergo atrophy or hypertrophy according to mechanical load. To date, the molecules that mediate muscle plasticity remain unclear.

Using different models inducing muscle atrophy, we show that the transcription factor Srf is a mediator of mechanotransduction through the actin/Mrtfs/Srf pathway. Mechanical load abolition leads to G-actin nuclear accumulation, delocalization of Mrtf-A, an Srf coactivator, and Srf activity downregulation. This results in a decrease in Srf-dependent transcription. Many Srf target genes encode sarcomeric proteins such as α -skeletal actin, thus a downregulation of Srf-dependent transcription could participate to muscle atrophy. In addition, our results suggest that Srf activity decrease could affect mitochondrial network organization and autophagic flux in a way that remains to be determined.

Besides, using a satellite cell-specific conditional and inducible Srf knockout, we show that overload hypertrophy requires *Srf* expression by satellite cells. Myoblasts proliferation and early differentiation are not altered by Srf loss. However, mutant myoblasts are unable to fuse with myofibers during overload hypertrophy.

Altogether, our results demonstrate that Srf is an important player in skeletal muscle plasticity: it is a mediator of mechanotransduction *via* the actin/Mrtfs/Srf pathway and its expression by satellite cells is required for myoblasts to fuse with myofibers during overload hypertrophy.

Keywords: Mechano-transduction, muscle atrophy, satellite cell, skeletal muscle, Srf.

Laboratoire : Equipe Développement, Génétique et Physiopathologie musculaires, Département Développement, Reproduction et Cancer, Institut Cochin (INSERM U1016, CNRS UMR8104, Université Paris Descartes).