

# Contrôle moléculaire des adaptations musculaires à l'exercice

**Professeur Frédéric CHARBONNIER**

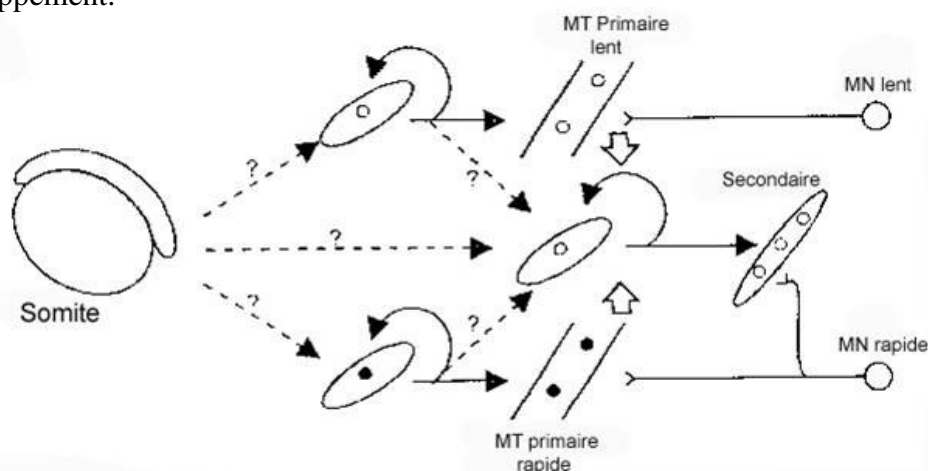
**Laboratoire de Neurobiologie des Réseaux Sensorimoteurs- CNRS/Université Paris Descartes**

Les travaux que je vais vous exposer ont été réalisés au sein du laboratoire de neurobiologie des réseaux sensorimoteurs à l'Université de Paris Descartes et portent sur les contrôles moléculaires des adaptations musculaires à l'exercice. La thématique générale de notre équipe vise en effet à comprendre les effets de l'exercice physique dans des pathologies humaines sévères affectant notamment le motoneurone.

On connaît chez l'homme deux grands types de pathologies génétiques qui touchent de manière privilégiée, voire exclusive le motoneurone : l'amyotrophie spinale infantile et la sclérose latérale amyotrophique. Ces deux pathologies correspondent à des maladies neurodégénératives qui vont entraîner une perte sélective des motoneurons qui elle-même engendre des déficits locomoteurs sévères pouvant aller jusqu'à la paralysie. Lorsque l'attente musculaire atteint des muscles vitaux, c'est le pronostic vital qui est engagé de manière inéluctable. Il n'existe actuellement aucune thérapie curative significative.

Parmi les atteintes musculaires associées à la maladie, on note l'atrophie (chute de la surface des fibres musculaires) et l'hypoplasie (diminution du nombre de fibres musculaires à l'intérieur du muscle). On constate également des transitions phénotypiques c'est-à-dire un changement du type de muscle : les muscles rapides deviennent plus lents et à l'inverse les muscles lents deviennent rapides.

Il est possible de s'interroger sur les mécanismes aboutissant à ces modifications. L'acquisition du phénotype musculaire est spécifique à chaque muscle et se met en place au cours du développement.



Spectre continu de fibres musculaires de +/- rapide à +/- lent

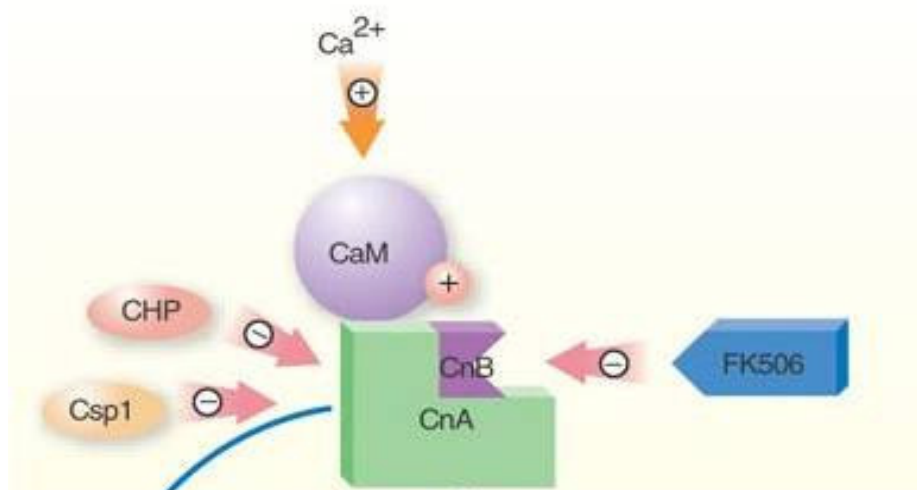
Ce phénotype musculaire acquis à la naissance va être sujet à une certaine plasticité qui se met en place en réponse à une modification de l'environnement et notamment à la charge de travail : il s'agit de passages progressifs et séquentiels d'un type de fibre musculaire à un autre qui concernent la fonction de la fibre musculaire. Ces transitions de fibres ne doivent toucher qu'une petite proportion de fibre musculaire. Dans le cas inverse, nous ferions face à un changement drastique et complet du muscle, ce qui n'est pas le cas dans un cadre de fonctionnement normal : il existerait donc une borne à cette plasticité.

On considère que lors d'une augmentation d'activité, une transition séquentielle vers l'acquisition d'un phénotype plus lent se réalise pour tous les muscles. Il ne s'agit pas de création de nouvelles fibres mais bien d'une modification du phénotype de fibres préexistantes. A l'inverse, en l'absence d'activité, les transitions de fibres vers un phénotype plus rapide seront importantes.

Nous nous sommes interrogés sur les relais moléculaires opérant le lien entre l'exercice physique et cette plasticité musculaire pour diriger l'évolution du phénotype et la régulation de ces phénomènes lorsque les changements dans la proportion des fibres musculaires atteignent leur niveau maximal.

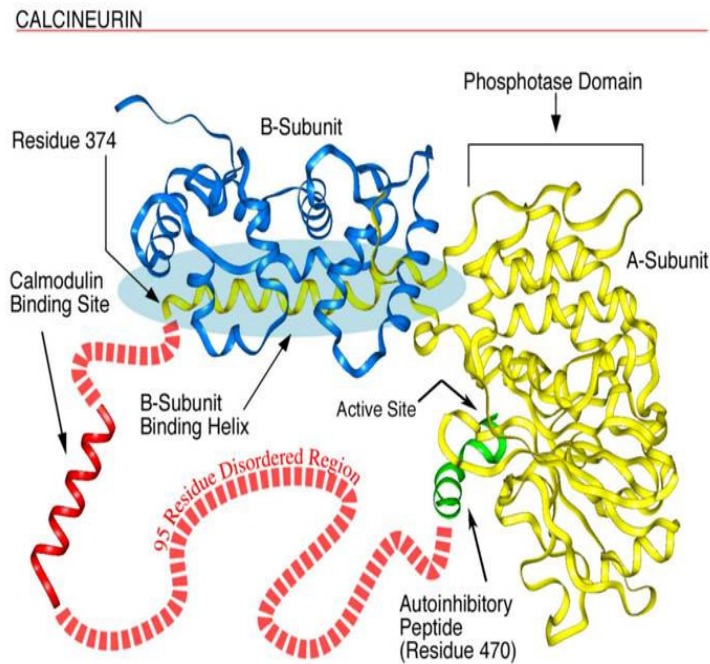
La voie calcineurine représente la voie majeure de ces transitions. La calcineurine est une protéine présente dans le muscle : il s'agit d'une sérine/thréonine phosphatase. Elle est peu active dans le muscle au repos. Ces calcineurines vont être activées par le calcium d'une manière directe et d'une manière indirecte qui est *a priori* la plus importante. Lorsqu'il y a stimulation par le motoneurone et contraction musculaire de la fibre, une libération de calcium s'opère. La calmoduline présente dans toutes les cellules possède une grande affinité pour le calcium.

La voie calcineurine



La calmoduline (CaM) fixe le calcium, Fixation A CnA, Déplacement d'un peptide auto-bloquant

Cette calmoduline dans la fibre musculaire dispose d'une conformation inactive : elle fixe le calcium libéré suite à la contraction musculaire, change de conformation et vient se fixer sur la calcineurine. Ce faisant, elle déplace un peptide bloquant sur la protéine et permet ainsi l'activation de la calcineurine.

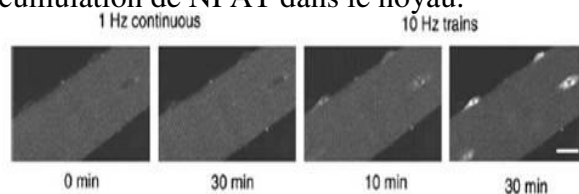


**La voie calcineurine**

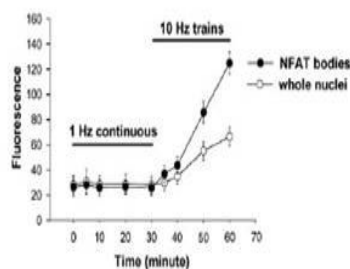
Dans le muscle squelettique, la calcineurine activée possède deux substrats majeurs : le facteur de transcription NFAT (Nuclear Factor of Activated T-Cells) présent dans de nombreuses cellules et le facteur MEF2 (Myocyte Enhancing Factor 2) qui est quant à lui spécifiquement musculaire.

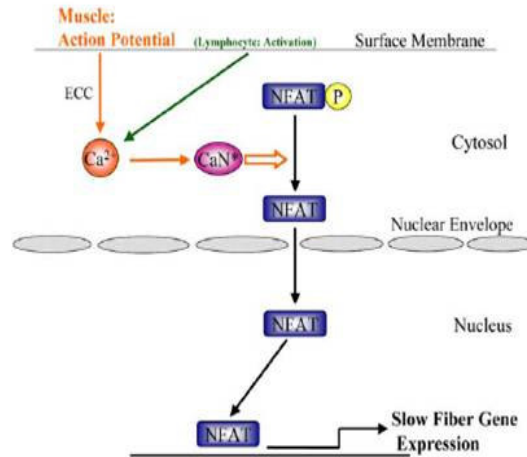
Une importante bibliographie est disponible concernant l'activation des NFAT. Pour ma part, j'ai choisi de vous présenter les résultats d'une étude sortie en 2005. Dans cette expérience, les fibres musculaires en culture sont stimulées de manière électrique. Une grande quantité de protéine de fusion NFAT couplée avec une protéine fluorescente (GFP) a été ajoutée à l'intérieur de ces fibres musculaires.

On observe que les noyaux s'éclairent au fur et à mesure de la stimulation électrique : ainsi, la stimulation entraîne l'accumulation de NFAT dans le noyau.



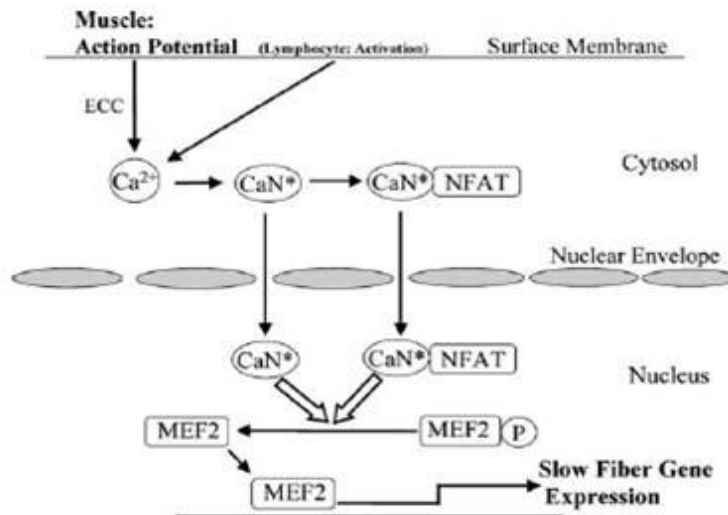
**Transfection de la protéine de fusion NFAT-GFP**





La déphosphorylation de NFAT découvre un site d'import nucléaire puis NFAT sera phosphorylé par une kinase nucléaire

Pour MEF2, le facteur de transcription se trouve déjà dans le noyau : il n'y aura pas de mécanisme d'import nucléaire. MEF2 va être activé par une déphosphorylation qui est catalysée par la calcineurine soit directement, soit par une association calcineurine-NFAT. MEF2, lorsqu'il est déphosphorylé, change légèrement de conformation, devient actif et va se fixer sur le promoteur des gènes musculaires lents. MEF2 peut également recruter d'autres enzymes.



Activation de MEF2

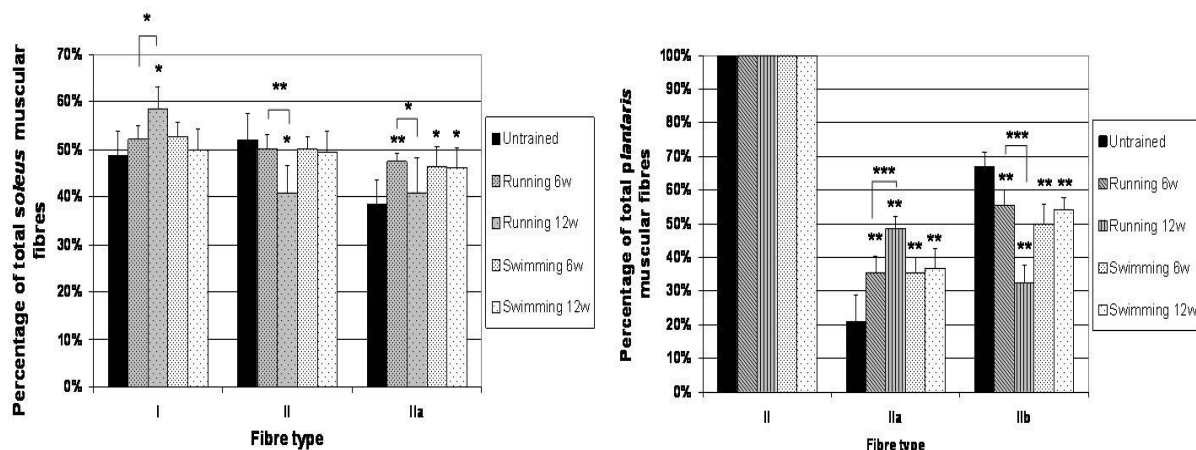
Dans le noyau des fibres musculaires rapides, le programme lent est éteint car la chromatine est condensée. Il existe des enzymes de remodelage de la chromatine qui doivent être adressés à un endroit particulier de l'ADN. Ils sont donc pris en charge par des facteurs de transcription qui disposent d'un site de fixation spécifique. Ainsi, cette chromatine qui était fermée dans les fibres musculaires rapides s'ouvre. Les gènes musculaires peuvent donc être exprimés et la transition vers un phénotype plus lent peut s'opérer.

Nous nous sommes intéressés à l'arrêt de ces transitions. Nous avons ainsi voulu mesurer l'activité enzymatique de la calcineurine pendant les transitions phénotypiques et lorsque ces dernières s'arrêtaient.

Nous avons utilisé des souris consanguines afin que toute modification puisse être imputée au changement d'environnement. Ces populations de souris ont été laissées à un état sédentaire ou ont été entraînées pendant six ou douze semaines suivant deux exercices : la course sur tapis roulant et un protocole de nage en piscine à courant. Nous avons étudié un muscle lent, le *soleus*, et un muscle rapide, le *plantaris*, au niveau de l'évolution du phénotype que nous avons comparé à la mesure de l'activité de la calcineurine.

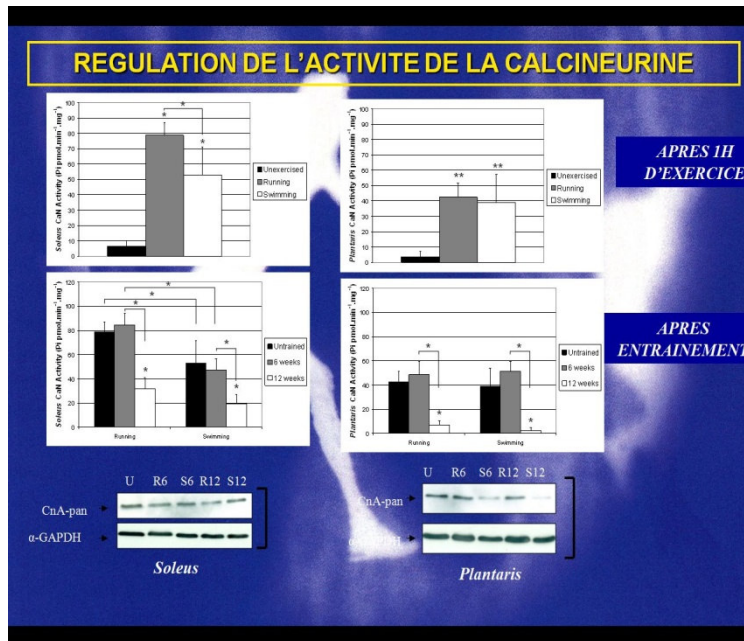
Je vous présente aujourd'hui des résultats d'immunohistochimie réalisés avec des anticorps spécifiquement dirigés contre les chaînes lourdes de la myosine.

En comparaison des sédentaires, les muscles *soleus* des souris entraînées à la course montrent un gain progressif de fibres de type I à six ou douze semaines, corrélé à une chute proportionnelle du nombre de fibres II. En revanche, pour la nage, les modifications ne concernent que les fibres II, avec une augmentation des IIA et une chute proportionnelle des IIb, et ces modifications cessent au bout de six semaines : on assiste à un arrêt des transitions phénotypiques. On retrouve globalement les mêmes tendances dans le *plantaris*. Ainsi, les transitions phénotypiques dépendent du type d'exercice et se terminent au bout de six ans en nage.



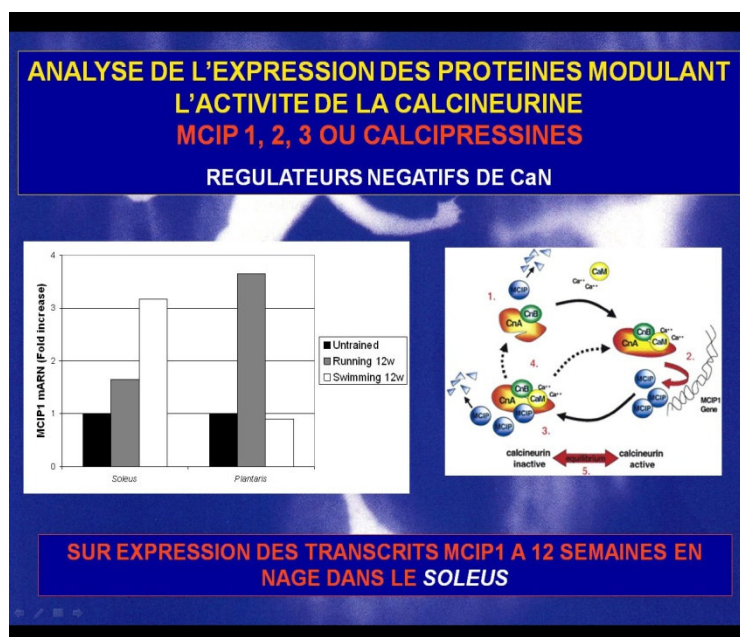
Les transitions dépendent de l'exercice

Nous avons, parallèlement à l'analyse de la typologie musculaire, étudié l'activité de la calcineurine. Nous avons vérifié l'existence d'une augmentation d'activité enzymatique induite par les deux types d'exercice dans les muscles des souris sédentaires soumises à une heure d'exercice. Nous avons ensuite comparé ces activités enzymatiques à six et douze semaines : si, à six semaines, l'activité de la calcineurine s'avère toujours importante, elle est quasiment inexistante à douze semaines. Le résultat est particulièrement frappant dans le *plantaris*.

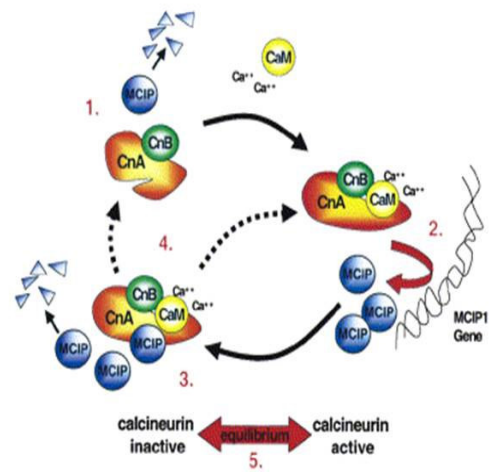
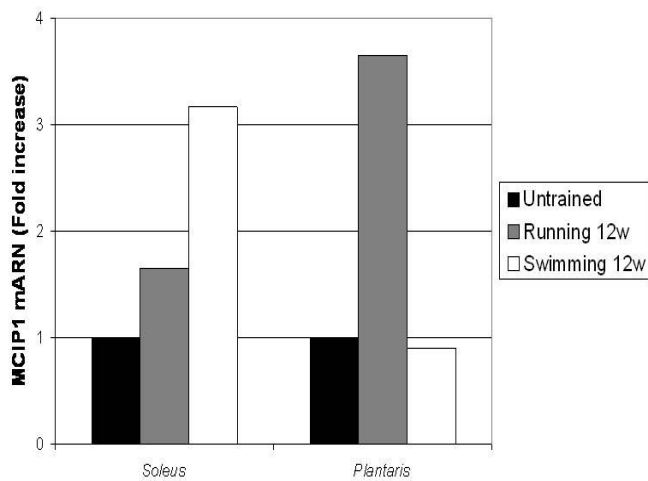


Ainsi, la calcineurine peut être activée dans les muscles des souris sédentaires. Au bout d'un certain moment, elle n'est plus « activable » et les transitions de fibres s'arrêtent et ne touchent au final qu'une petite population prédéfinie.

Nous avons recherché la cause de ce défaut d'activation dans les muscles entraînés. On remarque que la protéine, notamment sa sous-unité activatrice : la CnA, n'est plus détectable dans ces muscles à six semaines en course et à douze semaines en nage. Ainsi, au bout d'un certain temps d'entraînement, les cellules musculaires n'expriment plus la calcineurine. Ce faisant, aucune transition ne s'opérera. En revanche, cela n'explique pas pourquoi les transitions s'arrêtent dans le *soleus* en nage.



Nous avons alors étudié l'expression de certains inhibiteurs de cette calcineurine : les calcipressines. On observe des modifications de l'expression de cet inhibiteur spécifique de la calcineurine à six semaines dans le *soleus*.



Expression des protéines modulant l'activité de la Calcineurine

En conclusion, nous pouvons donc nous demander si la calcineurine peut constituer une cible pour limiter les transitions de fibres dans les muscles malades, notamment dans la SLA et la SMA.

## Questions-réponses avec l'amphithéâtre

**François CARRE**

J'ai appris que l'activité neuromotrice jouait un rôle dans les fibres musculaires et que l'innervation influait sur le type de fibres rapides ou lentes. Vous n'en parlez plus du tout lorsque vous évoquez la transition. Tient-on encore compte de cette innervation ?

**Frédéric CHARBONNIER**

On considère toujours l'unité motrice pour la mise en place du phénotype. En revanche, au niveau de l'évolution du phénotype, ces modifications s'opèrent aussi bien dans les fibres lentes que dans les fibres rapides mais pas de la même manière.

**François CARRE**

Lorsque l'on parle d'hypertrophie cardiaque physiologique ou pathologique, on sait désormais qu'il s'agit de voies métaboliques différentes et que la calcineurine n'est pas stimulée dans les deux cas. Existe-t-il également une autre voie de stimulation dans le muscle squelettique ?

**Frédéric CHARBONNIER**

C'est exact. Ces autres voies font intervenir des enzymes du remodelage de la chromatine.

**Jean-Pierre CERVETTI**

En jouant sur les activations et les inhibitions, n'est-on pas en présence d'une nouvelle forme de dopage ?

**Frédéric CHARBONNIER**

On ne connaît aujourd'hui aucun activateur pharmacologique de la calcineurine. Bientôt, peut-être.

**Stéphane BOUSSARD, fédération de motocyclisme**

Avez-vous envisagé, aux limites du bordage transitionnel, les influences sur l'asynchronisme de contraction musculaire ?

**Frédéric CHARBONNIER**

Nous nous sommes pour l'instant limités au niveau cellulaire et moléculaire. Nous ne disposons que de peu de latitude pour changer notre stimulation et la rendre reproductible sur ces populations.