



HAL
open science

Dopage : nouveaux médicaments influant sur la biogenèse musculaire et mitochondriale

Émeric Louvel

► **To cite this version:**

Émeric Louvel. Dopage : nouveaux médicaments influant sur la biogenèse musculaire et mitochondriale. Sciences pharmaceutiques. 2019. dumas-02279486

HAL Id: dumas-02279486

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-02279486>

Submitted on 5 Sep 2019

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

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

UNIVERSITE DE ROUEN
UFR DE MEDECINE ET DE PHARMACIE

Année 2019

N°

THESE

pour le diplôme d'Etat de
DOCTEUR EN PHARMACIE

Présentée et soutenue publiquement le 12 juin 2019

par

Emeric LOUVEL

Né(e) le 03 octobre 1994 à Le Havre (76)

**DOPAGE : NOUVEAUX MEDICAMENTS
INFLUANT SUR LA BIOGENESE MUSCULAIRE
ET MITOCHONDRIALE**

Directeur de thèse

Monsieur le Professeur Jean Pierre GOULLÉ

Président du jury : Pr Jean Pierre GOULLÉ, Professeur émérite

Membres du jury : Pr Michel GUERBET, Professeur

Pr Philippe VÉRITÉ, Professeur

Dr Valérie HARENG, Docteur en pharmacie

« L'Université de Rouen et l'UFR de Médecine et de Pharmacie de Rouen n'entendent donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises dans cette thèse. Ces opinions sont propres à leurs auteurs. »

ANNEE UNIVERSITAIRE 2018 - 2019

U.F.R. SANTÉ DE ROUEN

DOYEN : **Professeur Pierre FREGER**

ASSESEURS : **Professeur Michel GUERBET**
Professeur Benoit VEBER
Professeur Guillaume SAVOYE

I - MEDECINE

PROFESSEURS DES UNIVERSITES – PRATICIENS HOSPITALIERS

Mr Frédéric ANSELME	HCN	Cardiologie
Mme Gisèle APTER	Havre	Pédopsychiatrie
Mme Isabelle AUQUIT AUCKBUR	HCN	Chirurgie plastique
Mr Jean-Marc BASTE	HCN	Chirurgie Thoracique
Mr Fabrice BAUER	HCN	Cardiologie
Mme Soumeya BEKRI	HCN	Biochimie et biologie moléculaire
Mr Ygal BENHAMOU	HCN	Médecine interne
Mr Jacques BENICHOU	HCN	Bio statistiques et informatique médicale
Mr Olivier BOYER	UFR	Immunologie
Mme Sophie CANDON	HCN	Immunologie
Mr François CARON	HCN	Maladies infectieuses et tropicales
Mr Philippe CHASSAGNE	HCN	Médecine interne (gériatrie)
Mr Vincent COMPERE	HCN	Anesthésiologie et réanimation chirurgicale
Mr Jean-Nicolas CORNU	HCN	Urologie
Mr Antoine CUVELIER	HB	Pneumologie
Mr Jean-Nicolas DACHER	HCN	Radiologie et imagerie médicale
Mr Stéfan DARMONI	HCN	Informatique médicale et techniques de communication
Mr Pierre DECHELOTTE	HCN	Nutrition
Mr Stéphane DERREY	HCN	Neurochirurgie
Mr Frédéric DI FIORE	CB	Cancérologie
Mr Fabien DOGUET	HCN	Chirurgie Cardio Vasculaire
Mr Jean DOUCET	SJ	Thérapeutique - Médecine interne et gériatrie

Mr Bernard DUBRAY	CB	Radiothérapie
Mr Frank DUJARDIN	HCN	Chirurgie orthopédique - Traumatologique
Mr Fabrice DUPARC	HCN	Anatomie - Chirurgie orthopédique et traumatologique
Mr Eric DURAND	HCN	Cardiologie
Mr Bertrand DUREUIL	HCN	Anesthésiologie et réanimation chirurgicale
Mme Hélène ELTCHANINOFF	HCN	Cardiologie
Mr Manuel ETIENNE	HCN	Maladies infectieuses et tropicales
Mr Thierry FREBOURG	UFR	Génétique
Mr Pierre FREGER	HCN	Anatomie - Neurochirurgie
Mr Jean François GEHANNO	HCN	Médecine et santé au travail
Mr Emmanuel GERARDIN	HCN	Imagerie médicale
Mme Priscille GERARDIN	HCN	Pédopsychiatrie
M. Guillaume GOURCEROL	HCN	Physiologie
Mr Dominique GUERROT	HCN	Néphrologie
Mr Olivier GUILLIN	HCN	Psychiatrie Adultes
Mr Didier HANNEQUIN	HCN	Neurologie
Mr Claude HOUDAYER	HCN	Génétique
Mr Fabrice JARDIN	CB	Hématologie
Mr Luc-Marie JOLY	HCN	Médecine d'urgence
Mr Pascal JOLY	HCN	Dermato – Vénérologie
Mme Bouchra LAMIA	Havre	Pneumologie
Mme Annie LAQUERRIERE	HCN	Anatomie et cytologie pathologiques
Mr Vincent LAUDENBACH	HCN	Anesthésie et réanimation chirurgicale
Mr Joël LECHEVALLIER	HCN	Chirurgie infantile
Mr Hervé LEFEBVRE	HB	Endocrinologie et maladies métaboliques
Mr Thierry LEQUERRE	HB	Rhumatologie
Mme Anne-Marie LEROI	HCN	Physiologie
Mr Hervé LEVESQUE	HB	Médecine interne
Mme Agnès LIARD-ZMUDA	HCN	Chirurgie Infantile
Mr Pierre Yves LITZLER	HCN	Chirurgie cardiaque
Mr Bertrand MACE	HCN	Histologie, embryologie, cytogénétique
M. David MALTETE	HCN	Neurologie
Mr Christophe MARGUET	HCN	Pédiatrie
Mme Isabelle MARIE	HB	Médecine interne
Mr Jean-Paul MARIE	HCN	Oto-rhino-laryngologie
Mr Loïc MARPEAU	HCN	Gynécologie - Obstétrique
Mr Stéphane MARRET	HCN	Pédiatrie
Mme Véronique MERLE	HCN	Epidémiologie
Mr Pierre MICHEL	HCN	Hépatogastro-entérologie

M. Benoit MISSET (<i>détachement</i>)	HCN	Réanimation Médicale Mr Jean-François
MUIR (<i>urnombre</i>)	HB	Pneumologie
Mr Marc MURAINÉ	HCN	Ophthalmologie
Mr Christophe PEILLON	HCN	Chirurgie générale
Mr Christian PFISTER	HCN	Urologie
Mr Jean-Christophe PLANTIER	HCN	Bactériologie - Virologie
Mr Didier PLISSONNIER	HCN	Chirurgie vasculaire
Mr Gaëtan PREVOST	HCN	Endocrinologie
Mr Jean-Christophe RICHARD (<i>détachement</i>)	HCN	Réanimation médicale - Médecine d'urgence
Mr Vincent RICHARD	UFR	Pharmacologie
Mme Nathalie RIVES	HCN	Biologie du développement et de la reproduction
Mr Horace ROMAN (<i>disponibilité</i>)	HCN	Gynécologie - Obstétrique
Mr Jean-Christophe SABOURIN	HCN	Anatomie - Pathologie
Mr Guillaume SAVOYE	HCN	Hépatogastrologie
Mme Céline SAVOYE-COLLET	HCN	Imagerie médicale
Mme Pascale SCHNEIDER	HCN	Pédiatrie
Mr Michel SCOTTE	HCN	Chirurgie digestive
Mme Fabienne TAMION	HCN	Thérapeutique
Mr Luc THIBERVILLE	HCN	Pneumologie
Mr Christian THUILLEZ (<i>urnombre</i>)	HB	Pharmacologie
Mr Hervé TILLY	CB	Hématologie et transfusion
M. Gilles TOURNEL	HCN	Médecine Légale
Mr Olivier TROST	HCN	Chirurgie Maxillo-Faciale
Mr Jean-Jacques TUECH	HCN	Chirurgie digestive
Mr Jean-Pierre VANNIER (<i>urnombre</i>)	HCN	Pédiatrie génétique
Mr Benoît VEBER	HCN	Anesthésiologie - Réanimation chirurgicale
Mr Pierre VERA	CB	Biophysique et traitement de l'image
Mr Eric VERIN	HB	Service Santé Réadaptation
Mr Eric VERSPYCK	HCN	Gynécologie obstétrique
Mr Olivier VITTECOQ	HB	Rhumatologie
Mme Marie-Laure WELTER	HCN	Physiologie

MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES – PRATICIENS HOSPITALIERS

Mme Noëlle BARBIER-FREBOURG	HCN	Bactériologie – Virologie
Mme Carole BRASSE LAGNEL	HCN	Biochimie
Mme Valérie BRIDOUX HUYBRECHTS	HCN	Chirurgie Vasculaire
Mr Gérard BUCHONNET	HCN	Hématologie
Mme Mireille CASTANET	HCN	Pédiatrie
Mme Nathalie CHASTAN	HCN	Neurophysiologie
Mr Moïse COEFFIER	HCN	Nutrition
Mr Serge JACQUOT	UFR	Immunologie
Mr Joël LADNER	HCN	Epidémiologie, économie de la santé
Mr Jean-Baptiste LATOCHE	UFR	Biologie cellulaire
Mr Thomas MOUREZ (<i>détachement</i>)	HCN	Virologie
Mr Gaël NICOLAS	HCN	Génétique
Mme Muriel QUILLARD	HCN	Biochimie et biologie moléculaire
Mme Laëtitia ROLLIN	HCN	Médecine du Travail
Mr Mathieu SALAUN	HCN	Pneumologie
Mme Pascale SAUGIER-VEBER	HCN	Génétique
Mme Anne-Claire TOBENAS-DUJARDIN	HCN	Anatomie
Mr David WALLON	HCN	Neurologie
Mr Julien WILS	HCN	Pharmacologie

PROFESSEUR AGREGE OU CERTIFIE

Mr Thierry WABLE	UFR	Communication
Mme Mélanie AUVRAY-HAMEL	UFR	Anglais

II - PHARMACIE

PROFESSEURS DES UNIVERSITES

Mr Thierry BESSON	Chimie Thérapeutique
Mr Jean COSTENTIN (Professeur émérite)	Pharmacologie
Mme Isabelle DUBUS	Biochimie
Mr Abdelhakim ELOMRI	Pharmacognosie
Mr François ESTOUR	Chimie Organique
Mr Loïc FAVENNEC (PU-PH)	Parasitologie
Mr Jean Pierre GOULLE (Professeur émérite)	Toxicologie
Mr Michel GUERBET	Toxicologie
Mme Isabelle LEROUX - NICOLLET	Physiologie
Mme Christelle MONTEIL	Toxicologie
Mme Martine PESTEL-CARON (PU-PH)	Microbiologie
Mr Rémi VARIN (PU-PH)	Pharmacie clinique
Mr Jean-Marie VAUGEOIS	Pharmacologie
Mr Philippe VERITE	Chimie analytique

MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES

Mme Cécile BARBOT	Chimie Générale et Minérale
Mr Jérémy BELLIEN (MCU-PH)	Pharmacologie
Mr Frédéric BOUNOURE	Pharmacie Galénique
Mr Abdeslam CHAGRAOUI	Physiologie
Mme Camille CHARBONNIER (LE CLEZIO)	Statistiques
Mme Elizabeth CHOSSON	Botanique
Mme Marie Catherine CONCE-CHEMTOB	Législation pharmaceutique et économie de la santé
Mme Cécile CORBIERE	Biochimie
Mme Nathalie DOURMAP	Pharmacologie
Mme Isabelle DUBUC	Pharmacologie
Mme Dominique DUTERTE- BOUCHER	Pharmacologie
Mr Gilles GARGALA (MCU-PH)	Parasitologie
Mme Nejla EL GHARBI-HAMZA	Chimie analytique
Mme Marie-Laure GROULT	Botanique

Mr Hervé HUE	Biophysique et mathématiques
Mme Hong LU	Biologie
M. Jérémie MARTINET (MCU-PH)	Immunologie
Mme Marine MALLETER	Toxicologie
Mme Sabine MENAGER	Chimie organique
Mme Tiphaine ROGEZ-FLORENT	Chimie analytique
Mr Mohamed SKIBA	Pharmacie galénique
Mme Malika SKIBA	Pharmacie galénique
Mme Christine THARASSE	Chimie thérapeutique
Mr Frédéric ZIEGLER	Biochimie

PROFESSEURS ASSOCIES UNIVERSITAIRES

Mme Cécile GUERARD-DETUNCQ	Pharmacie officinale
Mme Caroline BERTOUX	Pharmacie officinale

PROFESSEUR CERTIFIE

Mme Mathilde GUERIN	Anglais
----------------------------	---------

ASSISTANT HOSPITALO-UNIVERSITAIRE

Mme Alice MOISAN	Virologie
Mme Anaïs SOARES	Bactériologie
M. Henri GONDE	Pharmacie

ATTACHES TEMPORAIRES D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE

Mme Sophie MOHAMED	Chimie Organique
---------------------------	------------------

LISTE DES RESPONSABLES DES DISCIPLINES PHARMACEUTIQUES

Mme Cécile BARBOT	Chimie Générale et minérale
Mr Thierry BESSON	Chimie thérapeutique
Mme Marie-Catherine CONCE-CHEMTOB	Législation et économie de la santé
Mme Elisabeth CHOSSON	Botanique
Mme Isabelle DUBUS	Biochimie
Mr Abdelhakim ELOMRI	Pharmacognosie
Mr Loïc FAVENNEC	Parasitologie
Mr Michel GUERBET	Toxicologie
Mr François ESTOUR	Chimie organique
Mme Isabelle LEROUX-NICOLLET	Physiologie
Mme Martine PESTEL-CARON	Microbiologie
Mr Mohamed SKIBA	Pharmacie galénique
Mr Rémi VARIN	Pharmacie clinique
M. Jean-Marie VAUGEOIS	Pharmacologie
Mr Philippe VERITE	Chimie analytique

III – MEDECINE GENERALE

PROFESSEUR MEDECINE GENERALE

Mr Jean-Loup **HERMIL** (PU-MG) UFR Médecine générale

MAITRE DE CONFERENCE MEDECINE GENERALE

Mr Matthieu **SCHUERS** (MCU-MG) UFR Médecine générale

PROFESSEURS ASSOCIES A MI-TEMPS – MEDECINS GENERALISTE

Mme Laëtitia **BOURDON** UFR Médecine Générale

Mr Emmanuel **LEFEBVRE** UFR Médecine Générale

Mme Elisabeth **MAUVIARD** UFR Médecine générale

Mr Philippe **NGUYEN THANH** UFR Médecine générale

Mme Marie Thérèse **THUEUX** UFR Médecine générale

MAITRE DE CONFERENCES ASSOCIE A MI-TEMPS – MEDECINS GENERALISTES

Mr Pascal **BOULET** UFR Médecine générale

Mr Emmanuel **HAZARD** UFR Médecine Générale

Mme Marianne **LAINÉ** UFR Médecine Générale

Mme Lucile **PELLERIN** UFR Médecine générale

Mme Yveline **SEVRIN** UFR Médecine générale

ENSEIGNANTS MONO-APPARTENANTS

PROFESSEURS

Mr Paul MULDER (phar)	Sciences du Médicament
Mme Su RUAN (med)	Génie Informatique

MAITRES DE CONFERENCES

Mr Sahil ADRIOUCH (med)	Biochimie et biologie moléculaire (Unité Inserm 905)
Mme Gaëlle BOUGEARD-DENOYELLE (med)	Biochimie et biologie moléculaire (UMR 1079)
Mme Carine CLEREN (med)	Neurosciences (Néovasc)
M. Sylvain FRAINEAU (med)	Physiologie (Inserm U 1096)
Mme Pascaline GAILDRAT (med)	Génétique moléculaire humaine (UMR 1079)
Mr Nicolas GUEROUT (med)	Chirurgie Expérimentale
Mme Rachel LETELLIER (med)	Physiologie
Mme Christine RONDANINO (med)	Physiologie de la reproduction
Mr Antoine OUVRARD-PASCAUD (med)	Physiologie (Unité Inserm 1076)
Mr Frédéric PASQUET	Sciences du langage, orthophonie
Mr Youssan Var TAN	Immunologie
Mme Isabelle TOURNIER (med)	Biochimie (UMR 1079)

CHEF DES SERVICES ADMINISTRATIFS : Mme Véronique DELAFONTAINE

HCN - Hôpital Charles Nicolle

HB - Hôpital de BOIS GUILLAUME

CB - Centre Henri Becquerel

CHS - Centre Hospitalier Spécialisé du Rouvray

CRMPR - Centre Régional de Médecine Physique et de Réadaptation

SJ – Saint Julien Rouen

TABLE DES MATIÈRES

Liste des tableaux.....	3
Liste des figures	3
Liste des abréviations.....	6
INTRODUCTION	13
CHAPITRE I : PHYSIOLOGIE DU MUSCLE STRIE SQUELETTIQUE	15
I.1 Rôles	16
I.2 Histologie (4)	16
I.2.1 Structure.....	16
I.2.2 Bases moléculaires de la contraction	21
I.3 Métabolisme (4)(14)	27
I.3.1 La phosphocréatine ou créatine-phosphate.....	28
I.3.2 La glycolyse.....	30
I.3.3 Le cycle de Krebs	31
I.3.4 La phosphorylation oxydative	32
I.3.5 La myokinase ou adénylate kinase	33
I.3.6 Rôle des peroxysomes (18).....	34
I.4 Typologies	34
I.4.1 Fibres I.....	35
I.4.2 Fibres II.....	35
I.5 Régénération	36
I.5.1 Trois étapes de la régénération	37
I.5.2 Action de la myostatine	38
CHAPITRE II : LES RECEPTEURS PPARs	47
II.1 Généralités sur les récepteurs nucléaires.....	47
II.2 Mécanisme d'action	48
II.2.1 Interaction ligand-récepteur	48
II.2.2 Interaction récepteur-ADN.....	50
II.3 Différents types de PPARs et leurs ligands endogènes et synthétiques	51

II.3.1. Mécanismes d'action des PPARs	52
II.3.2 structure des PPARs	54
II.3.3 PPAR α (42).....	55
II.3.4 PPAR γ	58
II.3.5 PPAR δ	61
CHAPITRE III : MEDICAMENTS AFFECTANT LE MUSCLE STRIE	
SQUELETTIQUE.....	65
III.1 Molécules agonistes	66
III.1.1 AICAR	67
III.1.2 Ligands REV-ERB.....	69
III.1.3 Composés activant les sirtuines (STACS)	70
III.1.4 Précurseurs du NAD ⁺	82
III.1.5 Agonistes AdipoR1	85
III.1.6 Agonistes PPAR δ	88
III.1.7 Agonistes ERR.....	96
III.2 Molécules antagonistes et inhibitrices	98
III.2.1 Inhibiteurs de la GCN5	99
III.2.2 MOTS-c	101
III.2.3 Inhibiteurs des voies de signalisation de la myostatine	103
III.2.4 Inhibiteurs de la NCoR-1	107
III.3 Obstacles à la détection des utilisateurs	107
III.4 Les cas de sportifs positifs déclarés par l'AMA à ce jour	110
CONCLUSION	114
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	116
SERMENT DE GALIEN.....	123

Liste des tableaux

Tableau 1 : Localisation, activité, interactions et implications biologiques des différentes SIRT (59)	74
Tableau 2 : Peptides modifiant la réponse des récepteurs à l'adiponectine (77)	87
Tableau 3 : Résultats de l'étude l'équipe de William J. Zuercher avec (a) Recrutement du peptide RIP140 NR-box dans le domaine de liaison au ligand et (b) Variation du recrutement du peptide par rapport aux interactions basales (94)	98
Tableau 4 : Evolution du nombre de résultats d'analyses anormaux au GW1516 entre 2012 et 2017 (113)	112

Liste des figures

Figure 1 : Catégorisation des muscles (2)	15
Figure 3 : Structure et disposition du filament épais (6)	19
Figure 5 : Contraction d'un sarcomère (9)	21
Figure 7 : Cycle d'un pont d'union (10)	22
Figure 8 : Etapes du fonctionnement de la jonction neuromusculaire (11)	23
Figure 10 : cycle des ponts d'union (13)	26
Figure 12 : Action des créatine-kinases (15)	29
Figure 14 : Représentation schématique des événements moléculaires régulant la régénération du muscle squelettique (21)	38
Figure 15 : Conséquences phénotypiques d'un déficit d'action de la myostatine chez des souris (A), un bovin (B) et un enfant (C)	40
Figure 16 : Présence de l'ARNm de la myostatine dans différents organes humains (30)	41
Figure 18 : Maturation et excrétion de la myostatine (31)	42
Figure 20 : Voies de signalisation de la myostatine (32)	44
Figure 22 : Mécanisme d'action des récepteurs stéroïdiens (36)	49
Figure 24 : Mode d'action des PPAR α (42)	52
Figure 25 : Activateurs endogènes des PPARs (43)	54

Figure 26 : Superposition des structures de PPAR α (blanc), PPAR δ (magenta) et PPAR γ (cyan) (44)	54
Figure 27 : Cibles médicamenteuses et leurs ligands pouvant influencer sur la biogénèse mitochondriale (50).....	65
Figure 29 : Molécule d'AICAR	67
Figure 31 : Structures de GSK4112 (1), SR9009 (2), SR9011 (3), SR10067 (4) et GSK2945 (5).....	70
Figure 33 : Réaction d'ADP-ribosylation d'une protéine par les sirtuines (57)	72
Figure 36 : Structures des activateurs polyphénoliques des sirtuines : (1) Resvératrol (R = H) et Picéatannol (R = OH) ; (2) Isoquiritigénine (R = H) et Butéine (R = OH) ; (3) Fisétine (R = H) et Quercétine (R = OH) (66)	78
Figure 38 : Structures des activateurs oxazolopyridines des sirtuines (66)	79
Figure 40 : Structures des activateurs imidazothiazoliques des sirtuines : SRT1460 (STAC-1) (1), SRT2183 (2), SRT1720 (STAC-4) (3), SRT2104 (4), SRT2183 (5) (66).....	81
Figure 41: Structures des activateurs thiazolopyridines des sirtuines (69).....	81
Figure 43 : Différentes voies de synthèse du NAD ⁺ chez <i>S. cerevisiae</i> (72)	83
Figure 45 : Molécule de nicotinamide riboside (NR) (75)	85
Figure 46 : Mécanisme d'action du récepteur AdipoR1 (76)	86
Figure 48 : Mécanisme d'activation du PPAR δ (49).....	89
Figure 49 : Les modifications de l'expression des gènes induites par PPAR δ entraîne une oxydation accrue des lipides. Les acides gras libres (FFA) pénètrent dans le muscle squelettique via le transporteur d'acide gras CD36, entraînant ainsi l'activation de gènes dépendant de PPAR δ telles que la protéine PDK4, inhibitrice de l'oxydation du glucose et de gènes promoteurs de l'oxydation des lipides, ou la protéine CD36 elle-même (49)	91
Figure 51 : Structure commune des acylhydrazones étudiées par l'équipe de William J. Zuercher (94)	98
Figure 53 : Structures de MB-3 (1) et CPTH2 (2)	100
Figure 55 : Résumé des cibles thérapeutiques des inhibiteurs de la voie de signalisation de la myostatine (107).....	104
Figure 56 : Spectres de masses des ions générés à partir des molécules protonées [M+H] ⁺ de GSK4112 et de l'un de ses dérivés métaboliques in vitro (50)	108

Figure 57 : Représentation schématique du test de détection immunologique des anticorps neutralisant la myostatine (111)	110
Figure 58 : Evolution du nombre d'échantillons analysés par l'AMA entre 2008 et 2017 (113).....	113

Liste des abréviations

α : alpha

β : bêta

δ : delta

γ : gamma

κ : kappa

μM : Micromolaire

5Me-THF : 5-méthyl-tétrahydrofolate

A : Adénine

aa : Acide aminé

ABCA : Adénosine triphosphate binding cassette A

AceCS : Acétylcoenzyme A synthase

ACL : Adénosine triphosphate citrate lyase

ActRIB : Récepteur à l'activine de type 1B

ActRIIB : Récepteur à l'activine de type 2B

ADAMS : Système de gestion et d'administration antidopage

AdipoR1 : Récepteur à l'adiponectine de type 1

ADN : Acide désoxyribonucléique

ADN Pol : Acide désoxyribonucléique polymérase

ADNr : Acide désoxyribonucléique ribosomique

ADP : Adénosine diphosphate

ADRV : Violation des règles antidopage

AF : Fonction d'activation

AICAR : 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1- β -D-ribofuranoside

AMA : Agence Mondiale Antidopage

AMP : Adénosine monophosphate

AMPC : Adénosine monophosphate cyclique

AMPK : Adénosine monophosphate-activated protein kinase

ANT : Translocateur de nucléotide à adénine

aP2 : Protéine adipocytaire 2

AP-1 : Protéine activatrice 1

apoA : Apolipoprotéine A

apoCIII : Apolipoprotéine C3
Arg : Arginine
ARN : Acide ribonucléique
ARNm : Acide ribonucléique messenger
ATP : Adénosine triphosphate
AUT : Autorisation d'usage à des fins thérapeutiques
BMP : bone morphogenetic protein
C : Cytosine
C-terminal : Terminaison carboxyle
C/EBP : CCAAT-enhancer-binding proteins
Ca²⁺ : Ion calcium
CaMKK : Protéine-kinase-kinase dépendante du calcium et de la calmoduline
CD36 : Cluster de différenciation 36
CDK4 : Kinase dépendante de la cycline 4
CI₅₀ : Concentration inhibitrice médiane
CID : Dissociation induite par collision
CK : Créatine-kinase
CO₂ : Dioxyde de carbone
CoA : Coenzyme A
COX : Cyclo-oxygénase
CPE : Cellule pro-génitrice de cellules endothéliales
CPS : Carbamoyl-phosphate synthétase
CPT : Carnitine palmitoyltransférase
CPTH2 : Cyclopentylidène-4-[4-(4'-chlorophényl)thiazol-2-yl]hydrazone
Cr : Créatine
CRM1 : Chromosomal maintenance 1
CRP : Protéine C réactive
Cys : Cystéine
Da : Dalton
DBD : Domaine de liaison à l'ADN
e⁻ : Electron
EC₅₀ : Concentration efficace 50
EMA : Agence Européenne du Médicament

Erk : Extracellular signal-regulated kinase
ERRs : Récepteurs liés aux œstrogènes
ERs : Récepteurs des œstrogènes
FABP : Fatty Acid-Binding Proteins
FAD : Flavine-adenine-dinucléotide (forme oxydée)
FADH₂ : Flavine-adenine-dinucléotide (forme réduite)
Fc : Fragment constant
FDA : Food and Drug Administration
FFA : Acides gras libres
FGF : Facteur de croissance des fibroblastes
FGFR : Récepteur du facteur de croissance des fibroblastes
FN3 : Fibronectine de type 3
FoxO : Forkhead box protein O
FRET : Transfert d'énergie de résonance par fluorescence
Fst : Follistatine
Fstl3 : Follistatine-like de type 3
G : Guanine
GASP-1 : Protéine sérique-1 associée au facteur de croissance et de différenciation
GDF : Growth and differentiation factor
GDH : Glutamate déshydrogénase
Glu : Glutamate
GLUT4 : Transporteur de glucose 4
H⁺ : Ion hydrogène
H₂O : Molécule d'eau
H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène
HAT : Histone acétyltransférase
HDL : Lipoprotéine de haute densité
HFD : Régime alimentaire riche en graisses
HGF : Facteur de croissance des hépatocytes
Hif-2 α : Facteur induit par l'hypoxie 2 α
HRE : Eléments de réponse aux hormones
HSP : Protéine de choc thermique
HUVEC : Cellules endothéliales de veines ombilicales humaines

ICAM-1 : Molécule d'adhésion intracellulaire-1
IFN : Interféron
Ig : Immunoglobuline
IGF : Insulin-like Growth Factor
IL : Interleukine
IMC : Indice de masse corporelle
iNOS : Oxyde nitrique synthase inductible
IRMS : Spectrométrie de masse à rapport isotopique du carbone
IS-GDR : Taux d'absorption du glucose par les tissus périphériques stimulé par l'insuline
JNK : c-Jun N-terminal kinase
Kb : Kilobase
LBD : Domaine de liaison du ligand
LC-MS/MS : Chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem
LDL : Lipoprotéine de basse densité
LDLR : Récepteur aux lipoprotéines de basse densité
Leu : Leucine
LIF : Facteur inhibiteur de la leucémie
LKB1 : Kinase hépatique B1
LPL : Lipoprotéine lipase
LPS : Lipopolysaccharide bactérien
LTBP : Protéine de liaison au facteur de croissance transformant bêta latent
Lys : Lysine
MB-3 : α -méthylène- γ -butyrolactone 3
MCP : Protéine chimio-attractrice des monocytes
MEK : Mitogen activated protein / Extracellular signal-regulated kinases
Mg²⁺ : Ion magnésium
MKK : Mitogen activated protein kinase kinase
mL : Millilitre
mM : Millimolaire
MMP : Métalloprotéinase matricielle

MOTS-c : cadre de lecture ouvert du peptide de type c de l'ARN ribosomal 12S
mitochondrial

MRF : Facteur de regulation myogénique

MSTN : Myostatine

mtADN : Acide désoxyribonucléique mitochondriale

Myf-5 : Facteur myogénique 5

N-terminal : Terminaison amine

NaAD⁺ : Acide nicotinique adénine dinucléotide

NAD⁺ : Nicotinamide adénine dinucléotide (forme oxydée)

NADH : Nicotinamide adénine dinucléotide (forme réduite)

NaMN : Acide nicotinique mononucléotide

NAMPT : Nicotinamide phosphoribosyltransférase

NCoR-1 : Co-répresseur des récepteurs nucléaires 1

NDUFA9 : Nicotinamide adénine dinucléotide déhydrogénase ubiquinine 1 alpha
subcomplex subunit 9

NFκB : Facteur de transcription nucléaire kappa B

ng : Nanogramme

Nma : Nicotinamide-nucleotide adenylyltransférase

NMN : Nicotinamide mononucléotide

NPCAL1 : Protéine Niemann-Pick C1-like 1

Npt1 : Nicotinate phosphoribosyltransférase

NR : Nicotinamide riboside

NRK : Nicotinamide riboside kinase

Nrk1

O₂ : Molécule d'oxygène

O₂⁻ : Molécule d'oxygène chargée négativement

OXPPOS : Phosphorylation oxydative

P : Phosphate

MAPK : Mitogen-activated protein kinase

Pax7 : Protéine paired box 7

PBA : Passeport Biologique des Athlètes

PCr : Phosphocréatine

PDC : Complexe pyruvate déshydrogénase

PDE : Phosphodiesterase

PDGF : Facteur de croissance dérivé des plaquettes

PDK : Pyruvate déshydrogénase kinase

PGC-1 α : Coactivateur 1-alpha des récepteurs activés par les proliférateurs de peroxysomes

PGI₂ : Prostacycline

pH : Potentiel hydrogène

Pi : Phosphate inorganique

PPAR : Récepteur activé par les proliférateurs de peroxysomes

PPRE : Elément de réponse aux proliférateurs de peroxysomes

PTEN : Phosphatase an tensin homolog

PVDF : Polyfluorure de vinylidène

R : Substrat organique

REV-ERB : Reverse strand of Erb

RIP140 : Protéine interagissant avec le récepteur de 140 kDa (kilodalton)

RXR : Récepteur X des rétinoïdes

Scd1 : Stéroyl-CoA-désaturase

SDS-PAGE : Electrophorèse en gel polyacrylamide contenant du laurylsulfate de sodium

Ser : Sérine

SIRT : Sirtuine

SLA : Sclérose latérale amyotrophique

Smad : Mothers against decapentaplegic

sORF : Cadres de lecture ouverts courts

STACS : Composés activant les sirtuines

STAT : Transducteur du signal et activateur de la transcription

T : Thymine

T β RI : Interactome du récepteur de type 1 du facteur de croissance transformant bêta

TAK1 : Kinase activée par le facteur de croissance transformant bêta

TCA cycle : Cycle de Krebs

TF : Facteur tissulaire

TGF- β : Facteur de croissance transformant bêta

TNF : Facteur de nécrose tumoral

UCP1 : Protéine découplante 1

VCAM-1 : Molécule d'adhésion vasculaire-1

VGEF : Facteur de croissance endothélial vasculaire

VLDL : Lipoprotéine de très basse densité

INTRODUCTION

Le dopage est le « fait d'administrer, d'inciter à l'usage, de faciliter l'utilisation, en vue d'une compétition sportive, de substances ou de procédés de nature à accroître artificiellement les capacités physiques d'une personne ou d'un animal ou de masquer leur emploi en vue d'un contrôle » (1). Depuis les temps les plus anciens l'humain a souvent dépassé les limites de la déontologie au profit d'accomplissements personnels. Cette perversion de la nature humaine explique la concomitance entre la naissance des compétitions sportives et celle du dopage. Au VI^{ème} siècle avant J.-C., à l'aube des premiers jeux olympiques antiques, les connaissances en physiologie humaine étant très limitées voire nulles, les athlètes utilisaient certaines viandes pour améliorer leurs performances. Les sauteurs en hauteur ingéraient de la viande de chèvre pour sauter plus haut et les lanceurs puisaient leur force dans la viande de taureaux. Au XX^{ème} siècle, l'explosion des connaissances scientifiques permit au dopage de se perfectionner en mimant ou en inhibant des phénomènes physiologiques de plus en plus complexes.

Aujourd'hui, le sport est devenu un véritable business, c'est une source de revenu exploitée par un nombre considérable de corps de métiers. L'appât du gain pousse malheureusement certains individus peu scrupuleux à vouloir faire leur place dans cette industrie en oubliant les valeurs fondamentales du sport. En 2020, combien seront ceux qui ne trembleront pas en entendant résonner le serment olympique de Pierre de Coubertin dans le stade de Tokyo ? Les sommes en jeu, en continuelle inflation et les techniques de dopage de plus en plus perfectionnées, combinées à la soif de gloire, risquent malheureusement d'augmenter cet effectif.

Le muscle étant le principal outil de travail du sportif, les utilisateurs de produits dopants ont toujours cherché à pousser la performance de celui-ci au-delà des limites physiologiques. Les stimulants comme les amphétamines et les antidouleurs comme le tramadol ont permis la surutilisation du muscle sans ressentir les signes de détresse renvoyés par ce dernier. L'EPO, les transfusions sanguines et les bronchodilatateurs ont permis d'augmenter la quantité de carburant mise à disposition du muscle pendant l'effort. Mais ces techniques sont maintenant bien connues des autorités de lutte antidopage, ce qui peut dissuader leurs potentiels utilisateurs.

Au cours de ces dernières années les connaissances sur les mécanismes moléculaires nécessaires à la fonction du muscle squelettique n'ont cessé de croître. Un grand nombre d'agents pharmacologiques ont été synthétisés dans le but de mimer un exercice physique physiologique. Ces candidats médicaments sont notamment développés pour combattre les maladies neuromusculaires, mais certains d'entre eux ont déjà été détournés par des sportifs pour améliorer leurs performances. De nouvelles molécules voient le jour chaque année et permettent aux tricheurs d'utiliser des produits encore indétectables par les techniques d'analyse actuelles.

Cette thèse a pour but de proposer un état des lieux des connaissances actuelles sur les molécules affectant les mécanismes de biogénèse mitochondriale musculaire et plus globalement de biogénèse myocytaire.

Ma thèse s'articule en trois grandes parties. Dans un premier temps nous ferons un rappel sur la physiologie du muscle squelettique, puis nous détaillerons le fonctionnement des récepteurs PPARs avant d'étudier les classes de candidats-médicaments découverts à ce jour. Enfin nous nous intéresserons successivement aux obstacles à la détection de ces molécules et aux cas de sportifs contrôlés positifs à ces dernières.

CHAPITRE I : PHYSIOLOGIE DU MUSCLE STRIE

SQUELETTIQUE

L'organisme humain est composé de deux types de muscles différents : les muscles non-striés (lisses) et les muscles striés. Les muscles striés sont divisés en deux sous-familles : les muscles squelettiques et le muscle cardiaque. On les nomme ainsi car ils présentent une alternance de bandes sombres et claires au microscope optique. Les muscles lisses et cardiaques sont innervés par le système nerveux autonome, leur contraction est involontaire. Ils permettent, entre autres, la progression du contenu d'organes creux comme le bol alimentaire dans le tube digestif ou la circulation sanguine. A l'inverse les muscles striés squelettiques sont innervés par le système nerveux somatique, leur contraction est volontaire, ils assurent un rôle de motricité dynamique. Ces muscles présentent cependant de nombreuses activités involontaires telles que le maintien de la posture, rendant possible la motricité statique. Les trois types de muscles présentent donc des structures différentes qui leur procurent des fonctions différentes.

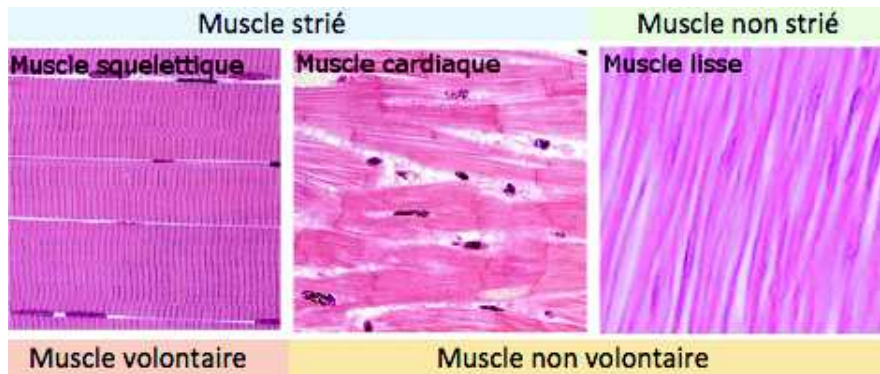


Figure 1 : Catégorisation des muscles (2)

Dans le cadre de cette étude nous nous intéresserons exclusivement au fonctionnement des muscles striés squelettiques. Comme leur nom l'indique, ces muscles sont fixés sur notre squelette, ils permettent sa mise en mouvement. Les muscles squelettiques représentent 40% du poids du corps chez un homme et 32% chez une femme.

I.1 Rôles

Les muscles squelettiques présentent de nombreuses fonctions dont certaines sont indispensables au bon fonctionnement de notre organisme. En particulier en exerçant un rôle majeur dans l'homéostasie. Ce processus est défini par la régulation de l'organisme dans le maintien des différentes constantes du milieu intérieur (ensemble des liquides de l'organisme) entre les limites des valeurs normales (3). Les muscles squelettiques sont indispensables à l'obtention de nutriments, nous les utilisons pour mâcher et avaler les aliments. Ils nous permettent de respirer. Leur production de chaleur remplit un rôle majeur dans la thermorégulation de l'organisme. Enfin, en étant garant de notre motricité dynamique, ils nous permettent d'éviter les dangers et assurent ainsi la protection de l'homéostasie.

Outre leurs rôles dans l'homéostasie, ces muscles ont un rôle social, ils nous permettent de jouir d'une certaine qualité de vie et sont indispensables à notre indépendance. A l'image de la relation entre les câbles porteurs et le tablier d'un pont, ils sont essentiels au maintien de la géométrie tridimensionnelle de notre squelette. Leur action sur notre posture nous confère donc une motricité statique. Enfin, les muscles squelettiques, nous attribuent une motricité dynamique, grâce à eux nous pouvons nous mouvoir, faire du sport et nous livrer à des activités artistiques.

I.2 Histologie (4)

I.2.1 Structure

Le muscle squelettique est constitué de nombreuses fibres parallèles occupant toute la longueur du muscle, entourées par du tissu conjonctif. Nous allons définir successivement ses différents constituants. Les niveaux d'organisation du muscle peuvent être schématisés par le schéma suivant :



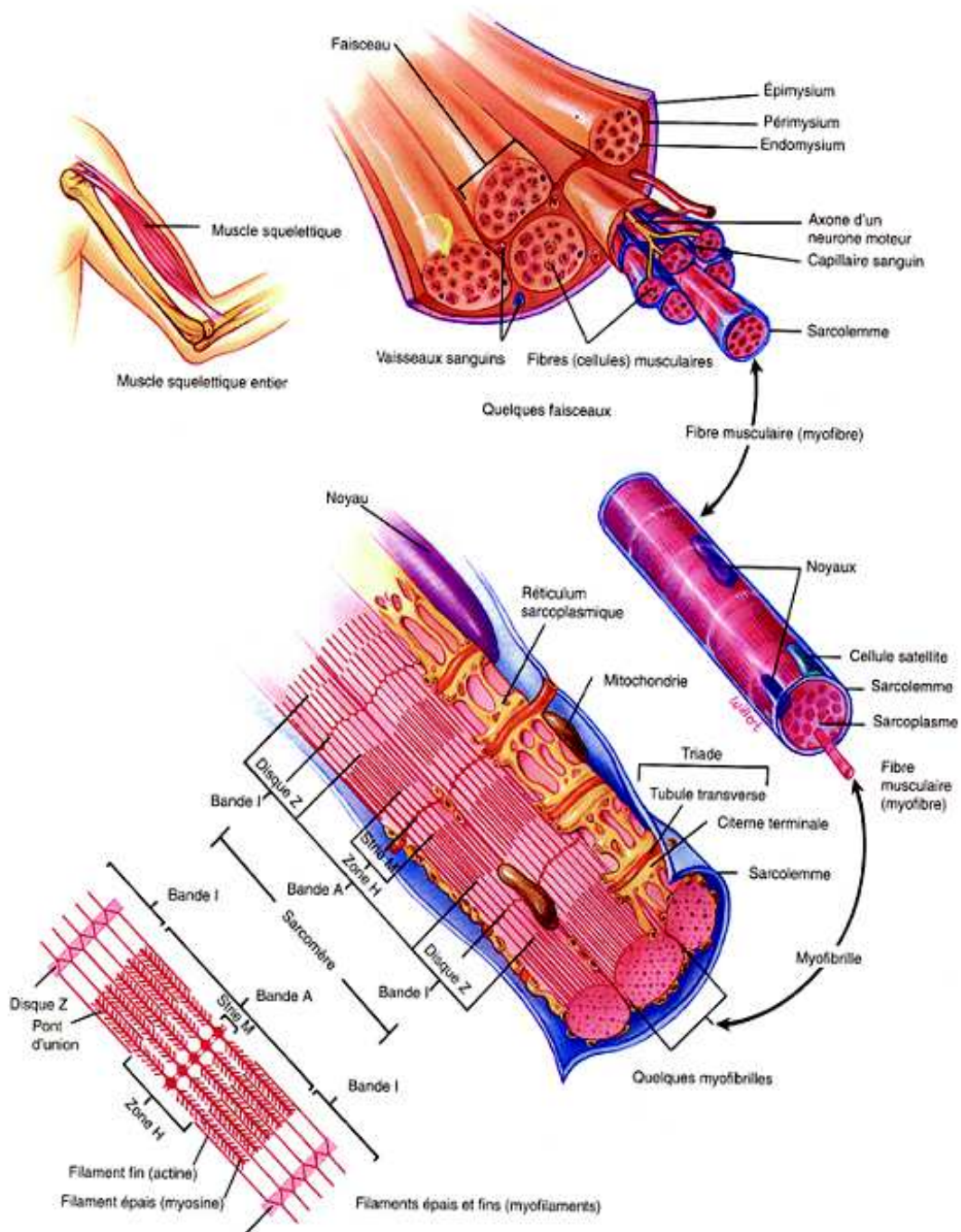


Figure 2 : Niveau d'organisation du muscle squelettique (5)

I.2.1.1 La myofibrille

Les myofibrilles sont des éléments intracellulaires cylindriques contractiles spécialisés qui occupent 80% du volume de la fibre en allant d'un bout à l'autre de

celle-ci. Elles sont constituées d'éléments du cytosquelette disposés de façon régulière : les filaments fins (assemblage de protéines d'actine) et épais (assemblages de protéines de myosine).

En microscopie optique, la myofibrille est une alternance de bandes sombres (bandes A) et claires (bandes I) alignées de façon parallèle, lui conférant son apparence striée.

I.2.1.2 La bande A

C'est un faisceau constitué de filaments épais et de la partie des filaments fins qui chevauchent leurs deux extrémités. La zone la plus claire située au centre de la bande A n'est constituée que de la partie centrale des filaments épais, elle est dénuée de filaments fins. Elle porte le nom de zone H.

I.2.1.3 La bande I

Elle contient la partie des filaments fins qui n'appartient pas à la bande A ainsi qu'une partie des molécules de titine. Elle contient donc des filaments fins appartenant à deux sarcomères adjacents.

I.2.1.4 La ligne M

C'est un ensemble de protéines de soutien reliant transversalement les filaments épais d'un même faisceau. Elle est donc située au milieu de la bande A et de la zone H.

I.2.1.5 Le disque Z (ou ligne Z)

C'est la ligne sombre transversale, située au milieu de la bande I. Il est constitué d'un assemblage de protéines du cytosquelette reliant les filaments fins de deux sarcomères contigus.

I.2.1.6 Le sarcomère

C'est la zone de myofibrilles comprise entre deux disques Z. Le sarcomère est l'unité fonctionnelle de base du muscle squelettique. A l'instar du néphron dans le rein, une unité fonctionnelle d'un organe est le plus petit élément capable d'exécuter toutes les fonctions de l'organe.

I.2.1.7 Le tubule transverse T

C'est le prolongement de la membrane qui s'enfonce perpendiculairement à la surface dans la profondeur des fibres musculaires à la jonction entre les bandes A et I des myofibrilles.

I.2.1.8 Le réticulum sarcoplasmique

C'est un réticulum endoplasmique particulier qui forme un réseau de fins tubules courant le long des myofibrilles. Il est constitué de segments distincts qui entourent chaque bande A et chaque bande I. Les extrémités de chacun de ces segments sont dilatées et communiquent avec les tubules T. Ce sont les citernes latérales.

I.2.1.9 Le filament épais

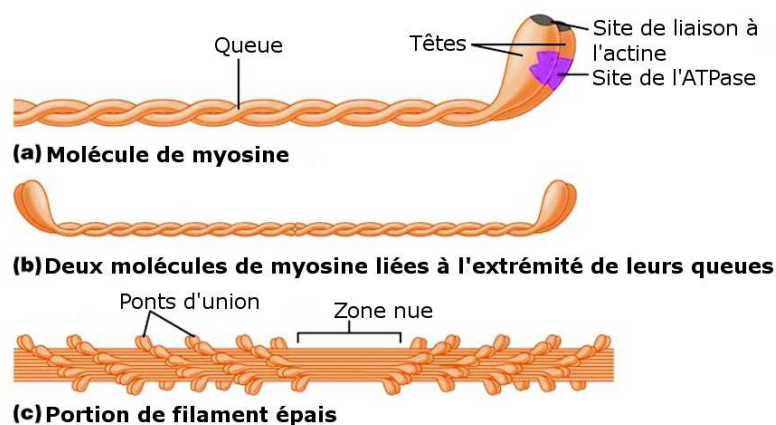


Figure 3 : Structure et disposition du filament épais (6)

Plusieurs centaines de molécules de myosine forment un filament épais. Une molécule de myosine comporte une paire de têtes. Les molécules de myosine sont

assemblées deux par deux au niveau de leurs queues. Les deux molécules ainsi appareillées sont chacune dirigées dans une direction différente du sarcomère. Les filaments épais sont donc symétriques de part et d'autre de la ligne M. Les têtes de myosine forment les ponts d'union entre les filaments épais et fins. Ces ponts d'union présentent chacun un rôle de liaison aux filaments fins et une activité ATPase.

I.2.1.10 Le filament fin

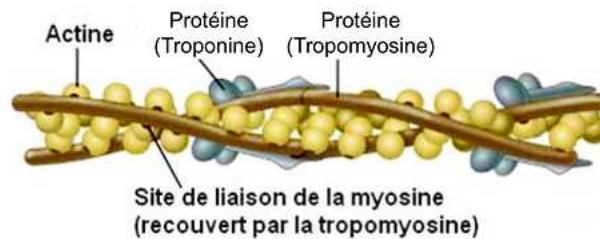


Figure 4 : Constitution du filament fin (7)

Les filaments fins sont deux à trois fois moins gros que les filaments épais. Ils sont constitués de 3 protéines : l'actine, la troponine et la tropomyosine. L'actine est la protéine structurale de base du filament fin. Les molécules sont de forme sphérique, leur assemblage en deux rangs de perles enroulées forme l'actine filamenteuse. Chaque molécule d'actine a un site de liaison aux ponts d'union de la myosine. La myosine et l'actine sont donc des protéines contractiles. Pour empêcher cette contraction, des protéines de tropomyosine, en forme de filaments, sont disposées le long de la spirale d'actine sur les sites de liaison à la myosine. Le dernier composant du filament fin est la troponine, une protéine divisée en trois sous-unités. Un site de liaison à la tropomyosine, un site de liaison à l'actine et un troisième site de liaison au calcium. Les ions Ca^{2+} jouent un rôle de clé, lorsqu'ils sont absents du site de fixation à la troponine, cette dernière stabilise la tropomyosine en position bloquante, ce qui masque les sites de liaison aux ponts d'union. A l'inverse, la fixation d'un ion Ca^{2+} à la troponine décalera la molécule de tropomyosine, ce qui laissera apparents les sites de fixations de la myosine sur les molécules d'actine.

I.2.1.11 La titine (8)

C'est une protéine qui régule l'élasticité du sarcomère. La titine est liée au filament épais de myosine et s'étend du disque Z jusqu'à la ligne M, soit plus d'un micromètre de longueur.

I.2.2 Bases moléculaires de la contraction

I.2.2.1 Glissement des filaments

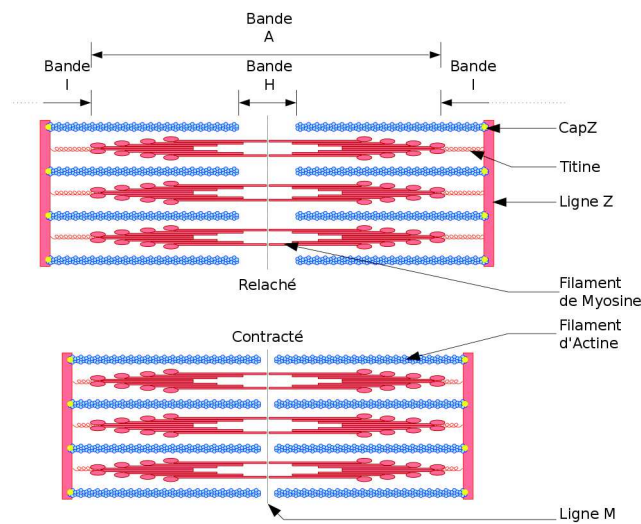


Figure 5 : Contraction d'un sarcomère (9)

La construction musculaire est due à un glissement des filaments épais sur les filaments fins et non à leur raccourcissement. La largeur des bandes A ne change pas. Les filaments épais se rapprochent des disques Z, ce qui provoque un raccourcissement de la largeur des bandes I et des zones H.

I.2.2.2 Flexion des ponts d'union

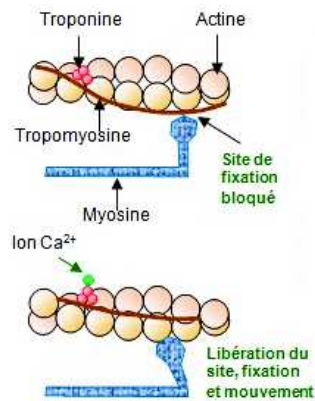


Figure 6 : Action du complexe tropomyosine-troponine sur le site de fixation (10)

Durant la contraction les filaments épais restent stationnaires, ils attirent les filaments fins vers le centre du sarcomère sous l'action des ponts d'union. Cette action n'est possible qu'après la libération des sites de liaisons à la myosine des molécules d'actine par les protéines de tropomyosine et de troponine. Cette libération des sites de liaison ne s'opère qu'en présence de calcium. L'ion se lie à la troponine pour écarter le complexe troponine-tropomyosine.

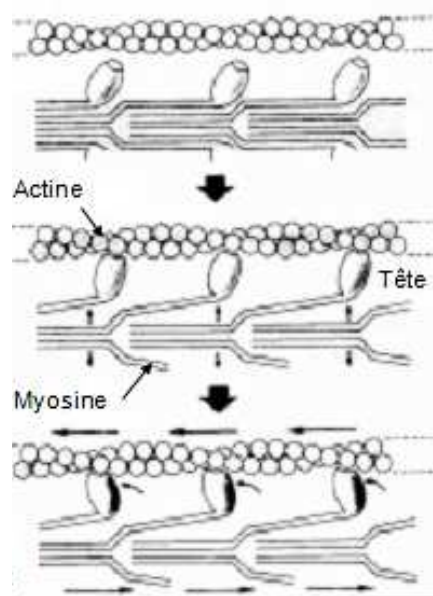


Figure 7 : Cycle d'un pont d'union (10)

Le déplacement des ponts d'union le long des molécules d'actine est réalisé de façon cyclique. Au début du cycle le pont d'union se lie à une molécule d'actine. Dans un deuxième temps la tête de myosine effectue une flexion, aussi appelée « coup de rame » pour attirer le filament fin vers le milieu du sarcomère. A la fin de cette flexion, le pont d'union se détache et retrouve son état initial. Le cycle recommence avec la liaison du pont d'union à une nouvelle molécule d'actine plus distale. Le mouvement de tous les ponts d'union induit le déplacement vers le centre du filament épais.

I.2.2.3 La jonction neuromusculaire

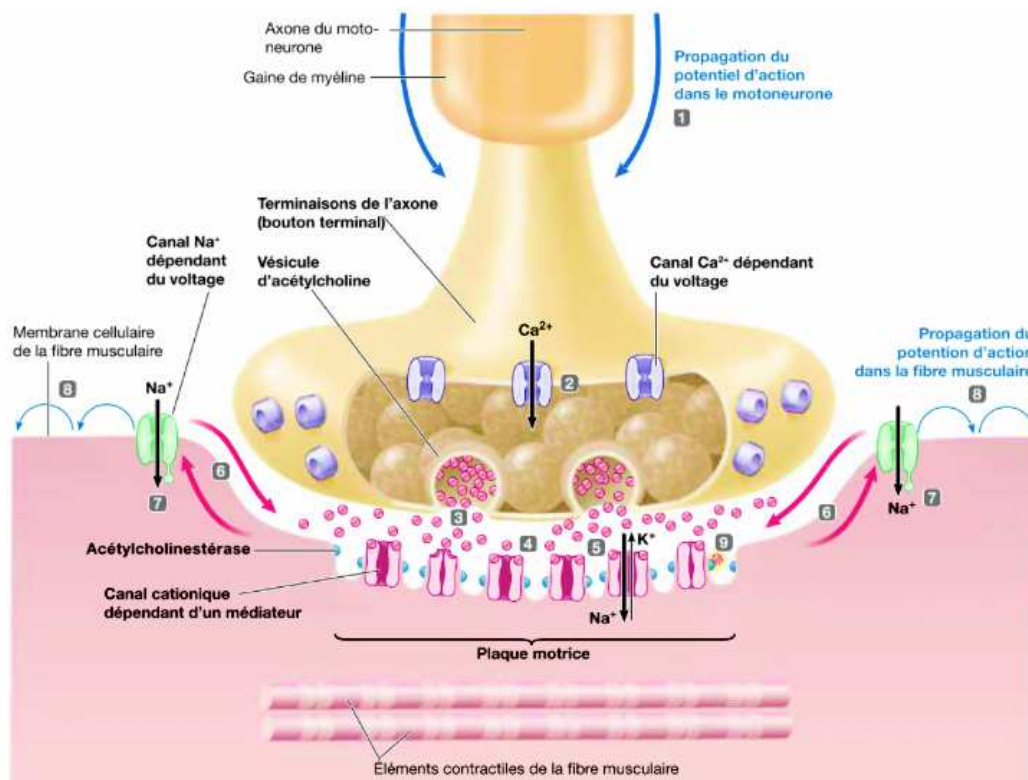


Figure 8 : Etapes du fonctionnement de la jonction neuromusculaire (11)

Nous venons de voir que la présence de calcium est indispensable à la contraction musculaire. Nous allons maintenant nous intéresser aux événements nécessaires à cet afflux de calcium dans le myocyte.

L'origine de ce phénomène se situe au niveau des jonctions neuromusculaires. Cette jonction est le lieu d'échanges chimiques entre le motoneurone et la cellule du muscle strié squelettique. Le corps cellulaire de ce motoneurone se situe dans le système nerveux central. C'est ici que naît le potentiel d'action qui sera transmis le long d'un gros axone myélinisé. A l'approche du muscle, l'axone se ramifie en de nombreuses

branches terminales qui formeront les jonctions neuromusculaires dans de légères dépressions à la surface des myocytes. La portion de la membrane cellulaire située sous la terminaison axonale est appelée plaque motrice.

Le neurotransmetteur de la jonction neuromusculaire est l'acétylcholine. Lorsque le potentiel d'action arrive à la terminaison axonale, il déclenche l'ouverture de canaux calciques dépendant du voltage et l'entrée consécutive de Ca^{2+} dans le bouton terminal. Le calcium déclenche la libération, par exocytose, d'acétylcholine par un certain nombre de vésicules. Chaque terminaison axonale contient des milliers de vésicules. L'acétylcholine diffuse dans la fente synaptique et se lie à ses récepteurs nicotiques au niveau de la plaque motrice. Cette liaison entraîne l'ouverture de canaux cationiques, provoquant une entrée de sodium ainsi qu'une moindre sortie de potassium. La plaque motrice se dépolarise, créant un potentiel de plaque qui provoquera l'ouverture de canaux sodiques dépendant du voltage dans les deux régions membranaires adjacentes. L'entrée du sodium abaisse le potentiel jusqu'au seuil, engendrant la naissance d'un potentiel d'action qui va se propager à toute la fibre par contiguïté. Ce potentiel est responsable de la contraction de celle-ci. La molécule d'acétylcholine est ensuite dégradée par l'acétylcholinestérase en une molécule d'acide acétique et une molécule de choline. Cette enzyme située dans la membrane de la plaque motrice met fin à la réponse de la cellule musculaire.

I.2.2.4 Propagation du potentiel d'action aux tubules T

Les tubules T étant des prolongements de la membrane superficielle, le potentiel d'action qui la parcourt se poursuit le long de ces premiers. L'activité électrique pénètre ainsi dans les profondeurs de la fibre pour modifier la perméabilité du réticulum sarcoplasmique.

I.2.2.5 Libération du calcium par le réticulum sarcoplasmique

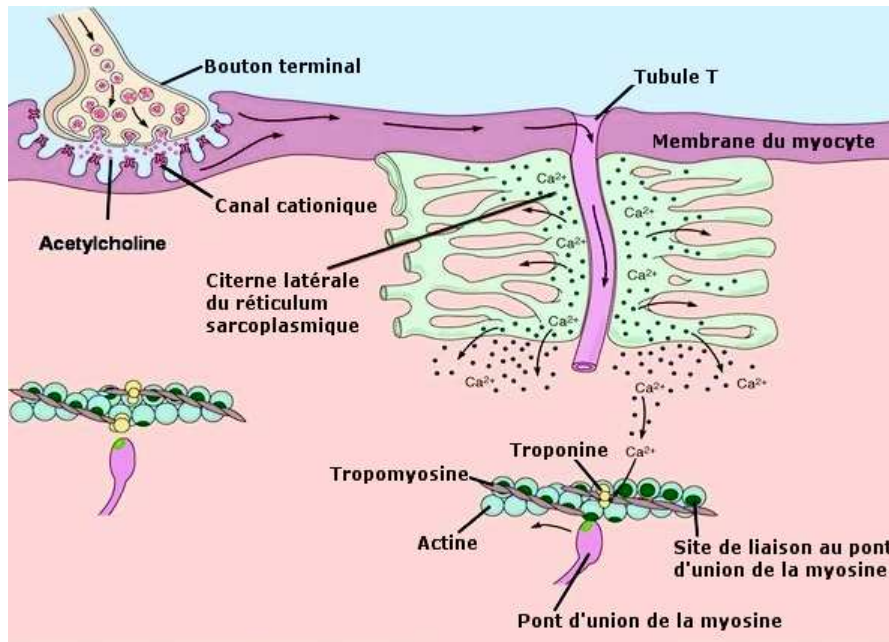


Figure 9 : rôle du calcium dans le couplage excitation-contraction (12)

Les citernes latérales du réticulum sarcoplasmique sont des réservoirs de calcium. Lorsque le potentiel d'action gagne le tubule T, il déclenche l'ouverture des canaux calciques du réticulum sarcoplasmique, et donc une libération des ions Ca^{2+} dans le cytosol. Ces ions vont aller se fixer sur la troponine, et ainsi engendrer le déplacement de l'ensemble tropomyosine-troponine de manière à démasquer les sites de liaisons de la myosine sur l'actine. Lorsque le potentiel d'action s'arrête, le Ca^{2+} est recapté par les pompes calcium-ATPase du réticulum sarcoplasmique, le muscle se relâche.

I.2.2.6 Rôle de l'adénosine triphosphate (ATP)

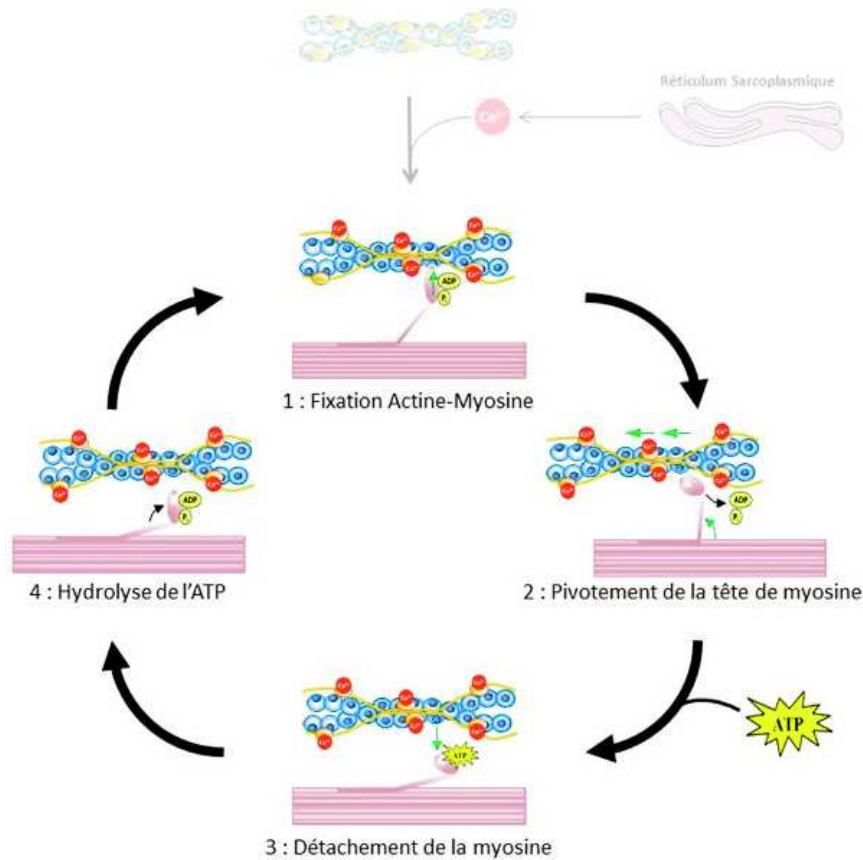


Figure 10 : cycle des ponts d'union (13)

L'ATP est le transporteur universel d'énergie, c'est lui qui fournit l'énergie aux ponts d'union des têtes de myosine. Un pont d'union comporte deux sites distincts : un site de liaison à l'actine et un site enzymatique capable de cliver l'adénosine triphosphate (ATP) en adénosine diphosphate (ADP) et en phosphate inorganique (Pi). Cette réaction confère au pont d'union l'énergie nécessaire à sa flexion. Flexion qui, rappelons-le, conduira au déplacement du filament fin vers le centre du sarcomère. L'activité ATPasique de la myosine n'est possible que si un ion magnésium (Mg^{2+}) est lié à l'ATP. L'ADP et le Pi restent liés à la myosine en attendant la liaison de cette dernière à l'actine. Une fois l'activité inhibitrice du complexe tropomyosine-troponine levée par le calcium, la liaison s'opère et donne lieu à la flexion (coup de rame) du pont d'union. Processus qui provoquera le détachement des molécules et d'ADP et de Pi. La rupture de la liaison entre les filaments fins et épais n'est possible qu'après la liaison d'une nouvelle molécule d'ATP sur le pont d'union. Le cycle des ponts d'union est ainsi bouclé.

I.3 Métabolisme (4)(14)

L'ATP est la seule source d'énergie utilisable en l'état par le myocyte pour se contracter. Cette molécule joue un rôle primordial dans trois étapes de la contraction et de la relaxation :

- L'hydrolyse de l'ATP en ADP et en P_i fournit l'énergie indispensable aux ponts d'union de la myosine.
- La liaison d'une nouvelle molécule d'ATP sur le pont d'union à la fin du cycle permet à ce dernier de se détacher de l'actine.
- Le retour du calcium dans le réticulum sarcoplasmique durant la relaxation est effectué par une pompe calcium-ATPase.

La quantité d'ATP stockée par la cellule n'est suffisante que pour un effort de quelques secondes. Le myocyte utilise donc plusieurs procédés pour fabriquer de l'ATP. L'orientation vers l'un des procédés métaboliques est fonction des conditions métaboliques et du type de fibre musculaire (I.4). Ces différentes sources musculaires d'ATP sont la phosphocréatine, la glycolyse utilisant le glucose sanguin ou le glycogène musculaire, le cycle de Krebs, la phosphorylation oxydative et la myokinase utilisant deux molécules d'ADP.

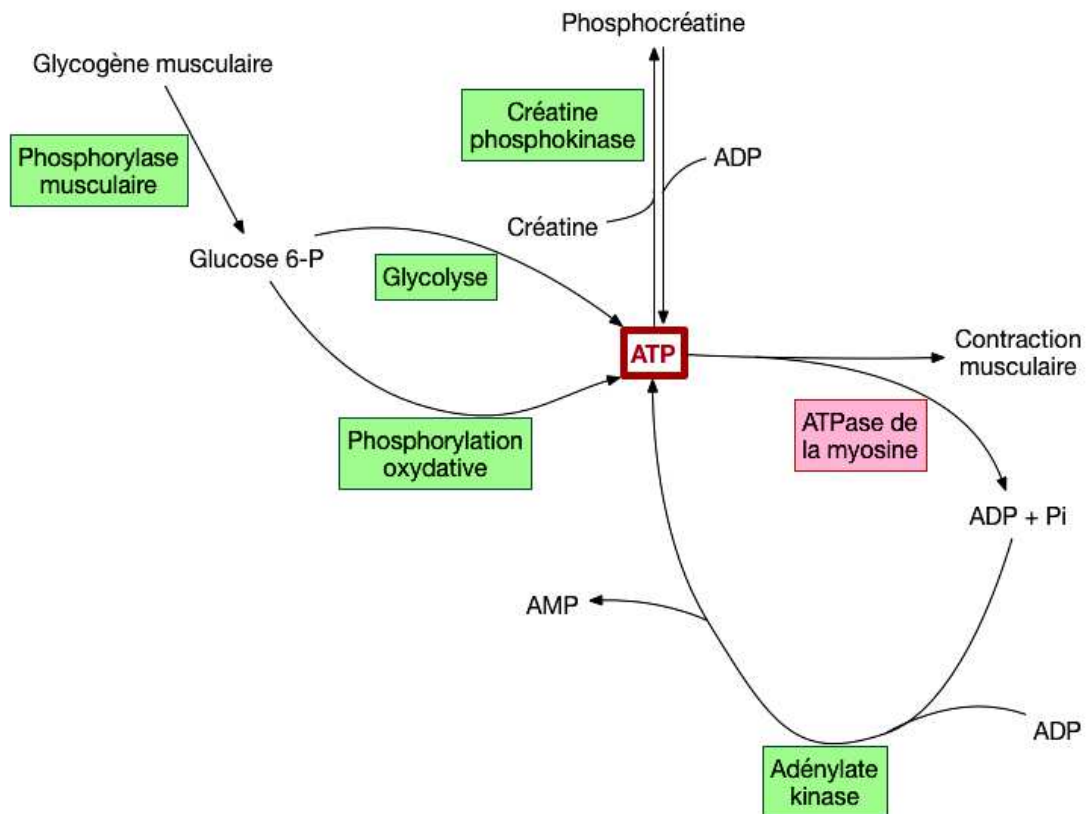


Figure 11 : Les différentes sources musculaires d'ATP

La dégradation complète du glucose en présence d'oxygène est appelée respiration cellulaire. La glycolyse, le cycle de Krebs et la phosphorylation oxydative sont les trois étapes de ce processus. Les cellules des muscles destinés à fournir des efforts prolongés, et donc faisant appel à la respiration cellulaire, sont capables de stocker de l'oxygène sous forme liée à l'hème de la myoglobine.

I.3.1 La phosphocréatine ou créatine-phosphate

La phosphocréatine (PCr) est une protéine de réserve énergétique présente dans le sarcoplasme du myocyte. Sa présence empêche l'épuisement rapide de l'ATP cellulaire. Cette source d'ATP est utilisée en premier lieu par le muscle au début de l'activité contractile après épuisement du faible stock d'ATP préexistant. Lors de la contraction, le stock de phosphocréatine est rapidement épuisé. Cette source d'énergie n'a donc l'exclusivité que dans les efforts intenses de courte durée comme le saut en hauteur, le sprint ou le lancer de poids.

Les créatine-kinases (CK) sont des enzymes capables d'opérer l'échange rapide d'un phosphate à haute énergie entre les molécules de créatine (Cr) et d'ADP. Elles catalysent donc la relation réversible suivante : $Cr + ATP \rightleftharpoons PCr + ADP$. Un muscle au repos contient environ cinq fois plus de créatine-phosphate que d'ATP.

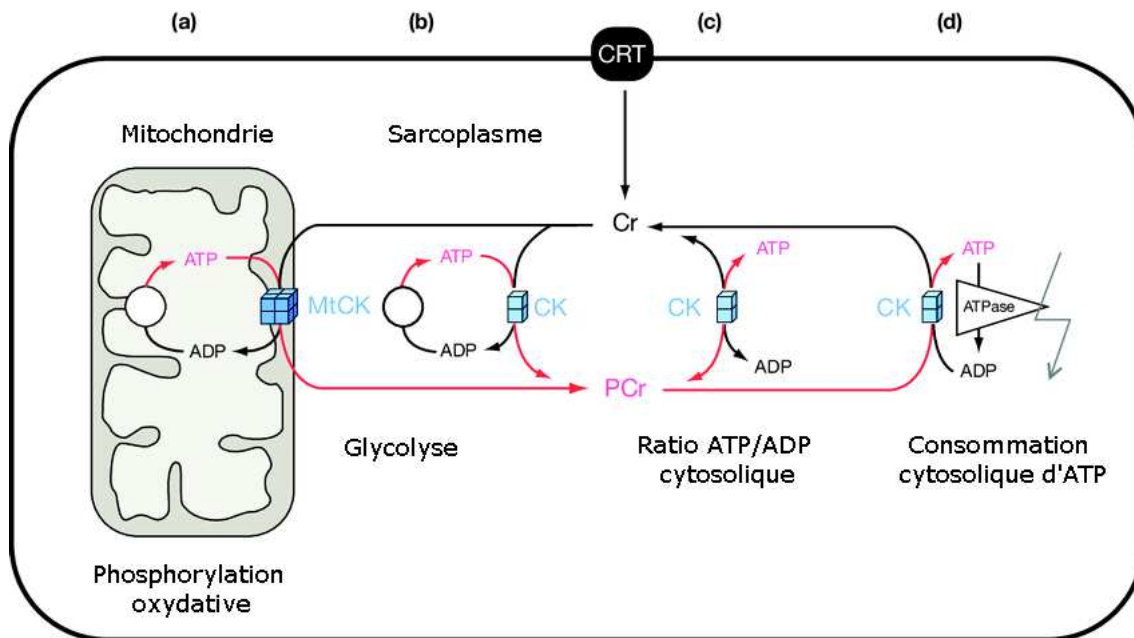


Figure 12 : Action des créatine-kinases (15)

Il existe quatre types de créatine-kinases différentes :

- La créatine-kinase mitochondriale (*Figure 12 a*) assure la production de créatine-phosphate à partir d'ATP formé lors de la phosphorylation oxydative (I.3.4). Cette enzyme n'est donc active qu'en phase de repos musculaire, lorsque la cellule n'a pas besoin d'ATP.
- La créatine-kinase couplant la glycolyse (I.3.2) à la synthèse de créatine-phosphate (*Figure 12 b*). Au même titre que la créatine-kinase mitochondriale, cette enzyme n'est active que lorsque la cellule régénère ses stocks de phosphocréatine en phase de repos.
- La créatine-kinase maintenant l'équilibre entre la créatine, la créatine-phosphate et l'ATP/ADP (*Figure 12 c*). Cette enzyme est donc la seule à pouvoir catalyser la réaction dans les deux sens.
- La créatine-kinase impliquée lors de grands besoins en ATP (*Figure 12 d*). C'est elle qui est utilisée lors de la contraction musculaire pour fournir rapidement de

l'énergie à la cellule. Elle catalyse uniquement la réaction dans le sens de la production d'ATP.

I.3.2 La glycolyse

La glycolyse est une suite de réactions cytosoliques qui permettent à la cellule de générer de l'ATP à partir du glucose sanguin ou de ses propres réserves en glycogène. Des enzymes cellulaires vont être capables de transformer ces deux molécules en glucose-6-phosphate, la glucokinase pour le glucose et la glycogénase couplée à la phosphoglucomatase pour le glycogène. On notera déjà à ce stade que ces réactions sont consommatrices d'énergie car elles utilisent des molécules d'ATP. La glycogénolyse est stimulée en présence d'une forte concentration de calcium. Elle fait appel à la phosphorylase kinase qui contient une sous-unité fixatrice de Ca^{2+} capable d'activer cette enzyme après avoir fixé 4 ions Ca^{2+} . La noradrénaline et l'adrénaline sont, elles aussi, capables de stimuler la glycogénolyse. Ces catécholamines sécrétées suite à un stress ou une frayeur vont se lier aux récepteurs β -adrénergiques musculaires et induire une augmentation de la concentration musculaire en adénosine monophosphate cyclique (AMPc). L'AMPc est un second messenger capable de stimuler la glycogénolyse par de multiples moyens. L'insuline ainsi que le glucose-6-phosphate par un mécanisme de rétrocontrôle négatif sont quant-à-eux des inhibiteurs de cette réaction.

Une fois le glucose-6-phosphate synthétisé, la glycolyse va faire intervenir neuf enzymes différentes dans neuf réactions différentes pour aboutir à la formation de deux molécules de pyruvate à trois carbones. La glycolyse n'est pas une source d'énergie très efficace. Elle ne contribue qu'à la formation nette de deux molécules d'ATP par molécule de glucose. La cellule va utiliser ses mitochondries, sièges du cycle de Krebs et de la phosphorylation oxydative, pour synthétiser d'avantage d'ATP. Ces réactions ne sont néanmoins possibles qu'en conditions aérobies ; en anaérobie le pyruvate se transformera en lactate et provoquera des douleurs musculaires voir une acidose lactique dans les cas les plus extrêmes. Durant la glycolyse deux atomes d'hydrogènes sont libérés avant d'être captés par des accepteurs d'hydrogène : deux molécules de nicotinamide-adénine-dinucléotide (NAD^+) pour former deux molécules de NADH. Nous verrons ensuite, qu'en condition aérobie, ces molécules sont utilisées par le

système de transport d'électrons de la phosphorylation oxydative pour produire de l'ATP.

I.3.3 Le cycle de Krebs

En présence d'oxygène le pyruvate sera transporté dans la matrice mitochondriale à l'aide d'un mécanisme de symport de protons. Une fois arrivé dans la mitochondrie, le pyruvate est scindé en une molécule d'acide acétique et une molécule de dioxyde de carbone (CO_2). Le CO_2 est éliminé par l'organisme comme un déchet et l'acide acétique est couplé au coenzyme A (CoA) pour former l'acétyl coenzyme A (acétyl-CoA). Cette molécule d'acétyl-CoA pourra se coupler à une molécule d'oxaloacétate et ainsi entrer dans le cycle de Krebs. Ce cycle est un enchainement de 8 réactions catalysées par des enzymes de la matrice mitochondriale. Au cours de ces réactions, les deux carbones provenant de l'acide acétique de départ seront transformés en deux molécules de CO_2 et l'oxaloacétate sera régénéré en fin de cycle pour pouvoir se coupler à une autre molécule d'acide acétique. Quatre réactions du cycle de Krebs libèrent des atomes d'hydrogène. Ces atomes sont captés par des accepteurs d'hydrogène : le NAD^+ et le flavine-adénine-dinucléotide (FAD). Ces composés sont ainsi réduits en trois molécules de NADH et une molécule de FADH_2 qui seront traitées par le système de transport d'électrons de la phosphorylation oxydative. On dénombre enfin au cours du cycle de Krebs, l'utilisation de trois molécules d'eau, d'une molécule de coenzyme A et la formation d'une molécule d'ATP. Comme chaque molécule de glucose donne naissance à deux molécules d'acide acétique, le cycle produit donc deux molécules d'ATP par molécule de glucose métabolisée.

I.3.4 La phosphorylation oxydative

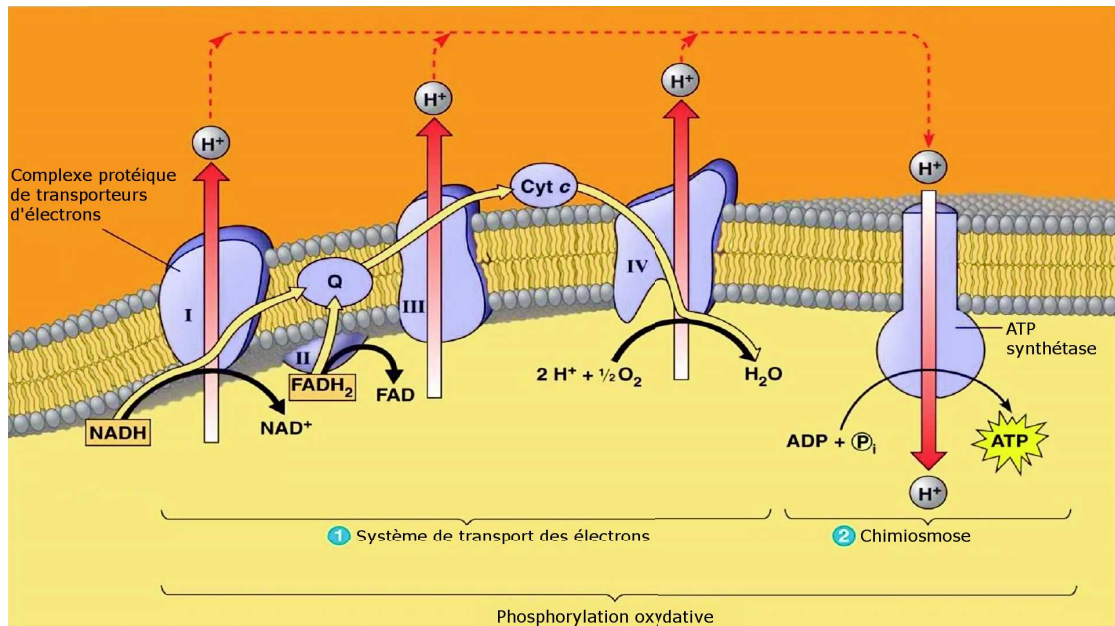


Figure 13 : La phosphorylation oxydative dans la membrane interne mitochondriale (16)

La phosphorylation oxydative implique deux groupes de protéines localisées dans la membrane interne mitochondriale : Le système de transport d'électrons et la chimiosmose par l'enzyme ATP synthétase. Les atomes d'hydrogène contenus dans les molécules de NADH et de FADH₂ contiennent des électrons à fort potentiel énergétique. Lors de la phosphorylation oxydative, le transfert de ces électrons à des molécules d'oxygène va engendrer la production d'ATP.

Le système de transport d'électron est composé de quatre transporteurs, aussi appelés complexes. Les deux premiers complexes vont extraire des paires d'électrons à haute énergie des hydrogènes contenus dans les molécules de NADH et de FADH₂. Le complexe I va extraire ces électrons en convertissant le NADH en NAD⁺ et en libérant un ion H⁺ (NADH → NAD⁺ + H⁺ + 2e⁻). De son côté, le complexe II va parvenir à cette extraction en convertissant le FADH₂ en FAD et deux ions H⁺ (FADH₂ → FAD + 2H⁺ + 2e⁻). Les molécules de NAD⁺ et de FAD ainsi libérées vont retourner sur les lieux de la glycolyse et du cycle de Krebs pour capter de nouveaux atomes d'hydrogène. Ces accepteurs d'hydrogène opèrent donc le lien entre les différentes réactions de la respiration cellulaire. Les électrons à forts potentiels énergétiques vont quitter les complexes I et II pour passer successivement dans les complexes III et IV et descendre progressivement vers des niveaux d'énergie inférieurs. Une partie de cette énergie est

perdue sous forme de chaleur et l'autre partie est récupérée par la mitochondrie pour faire passer les ions H^+ de la matrice mitochondriale vers l'espace intermembranaire. Ce transfert réalisé par les complexes I, III et IV sert à générer un gradient H^+ qui apportera de l'énergie à l'enzyme d'ATP-synthétase. La face intra-matricielle du complexe IV est le siège du transfert d'un électron faiblement énergétique à une molécule d'oxygène, ce qui engendrera une molécule d'oxygène chargée négativement (O_2^-). Cet ion O_2^- se combinera à un ion H^+ encore présent dans la matrice mitochondriale pour former une molécule d'eau (H_2O).

L'enzyme d'ATP-synthétase est composée de plusieurs éléments interconnectés : un canal à protons H^+ , enchevêtré dans la membrane interne couplé à la partie supérieure de l'enzyme (le chapeau), situé dans la matrice mitochondriale. Le gradient de H^+ provoquera le passage d'ions H^+ de l'espace intermembranaire vers la matrice en empruntant le canal de l'ATP-synthétase. Le flux de protons transmet de l'énergie à la partie supérieure de l'enzyme, ce qui permettra sa rotation. Ce phénomène engendre une modification de la conformation du chapeau, il va pouvoir capter de l'ADP et du P_i , les combiner et libérer de l'ATP. La synthèse d'ATP par l'ATP-synthétase est aussi appelée chimiosmose.

La phosphorylation oxydative permet la synthèse de 28 molécules supplémentaires d'ATP. On atteint donc un total de 32 ATP par molécule de glucose dégradée. On considère qu'une molécule de NADH engendre approximativement la synthèse de 2,5 molécules d'ATP contre 1,5 molécules pour le $FADH_2$. Cette inégalité est due à la différence de longueur de la chaîne de transport parcourue par ces deux familles de paires d'électrons. L'ATP est transportée de la mitochondrie vers le cytosol pour prendre part à la contraction musculaire.

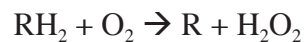
I.3.5 La myokinase ou adénylate kinase

Cette enzyme se situe dans l'espace intermembranaire mitochondriale. Elle catalyse l'interconnexion des nucléotides de l'adénine (AMP, ADP et ATP) : $ATP + AMP \Leftrightarrow 2ADP$. Cette réaction permet le maintien de l'homéostasie énergétique cellulaire en contrôlant la proportion des différents nucléotides cités précédemment. La proportion d'ATP provenant de la myokinase augmente avec la concentration

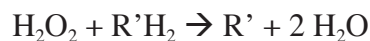
intracellulaire en ADP et en magnésium, ion agissant comme cofacteur de la réaction (17).

I.3.6 Rôle des peroxysomes (18)

Les peroxysomes sont des organites intracellulaires entourés d'une membrane, présents dans pratiquement toutes les cellules eucaryotes. Ils contiennent des enzymes oxydatives comme la catalase et l'urate oxydase à des concentrations très élevées, ce qui leur permet de jouer un rôle majeur dans la détoxification de nombreux déchets. Certaines enzymes éliminent des atomes d'hydrogène de substrats organiques spécifiques (désignés ici par R) grâce à une réaction oxydative produisant du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2 ou eau oxygénée) :



La catalase quant à elle utilise le H_2O_2 ainsi formé pour oxyder des substrats comme l'acide formique, le formaldéhyde et l'alcool selon la réaction suivante :



De plus, lorsqu'un excès d' H_2O_2 s'accumule dans la cellule, la catalase le transforme en eau :



L'une des fonctions majeures de ces réactions oxydatives est la β -oxydation des acides gras en acétyl Coa.

Ne disposant pas d'ADN ni de ribosome, toutes leurs protéines sont codées dans le noyau. Ces protéines contiennent une séquence spécifique de trois acides aminés (Ser-Lys-Leu), située à l'extrémité C-terminale, fonctionnant comme un signal d'importation peroxysomique.

I.4 Typologies

Les muscles squelettiques sont composés de trois types de fibres différentes. Les fibres de type I, oxydatives lentes, les fibres de type IIa oxydatives rapides et les fibres

de type IIb glycolytiques rapides. Ces fibres diffèrent donc selon leur vitesse de contraction et les voies enzymatiques prioritaires utilisées pour produire de l'ATP. La proportion de chacune de ces fibres est modifiée par les types d'exercices physiques effectués par le sujet. Ces modifications touchent la capacité de synthèse de l'ATP par la cellule et le diamètre de la fibre elle-même.

I.4.1 Fibres I

Les fibres de type I sont utilisées pour produire des efforts relativement longs, leur vitesse de contraction est lente. La faible activité ATPasique de la myosine permet d'optimiser au maximum les stocks d'ATP, ce qui combiné à une forte synthèse leur confère une certaine résistance à l'effort. Les cellules de ces fibres utilisent préférentiellement les filières énergétiques aérobies, elles sont innervées par un réseau de capillaires conséquent et très fournies en mitochondries et myoglobines. La forte présence de ces éléments confère à ces cellules une couleur rouge. La phosphorylation oxydative est la principale source d'énergie. On trouve peu de créatine-kinases, de glycogène et d'enzymes de la glycolyse anaérobie. La proportion des fibres de types I est plus élevée dans les muscles impliqués dans la posture et augmente dans certains muscles chez des sportifs s'entraînant en endurance.

I.4.2 Fibres II

La durée de contraction des fibres de type II est relativement courte. Ce sont des fibres capables de se contracter rapidement, mais elles s'épuisent donc beaucoup plus vite que les fibres de type I. Leur proportion augmente chez les sprinteurs.

Il existe deux types de fibres II dont la proportion d'utilisation des voies métaboliques diffère. Ces fibres contiennent des réserves en glycogène et des quantités de transporteurs de glucose, stimulés par l'insuline plus élevées que les fibres de type I (19).

I.4.2.1 Fibres IIa

Les fibres de type IIa se rapprochent des fibres I par leur forte capacité de phosphorylation oxydative. Elles sont très innervées, contiennent beaucoup de mitochondries et de myoglobines, elles sont donc aussi de couleur rouge. Elles utilisent la glycolyse anaérobie à plus forte échelle que les fibres I mais en plus petite proportion que les fibres IIb. Cette particularité provient d'un stock de glycogène plus élevé que les fibres I et plus faible que les fibres IIb, leur résistance à la fatigue occupe donc une place intermédiaire entre ces deux types de fibres.

I.4.2.2 Fibres IIb

Les fibres IIb sont les moins résistantes à la fatigue, leur capacité de phosphorylation oxydative est très limitée. Elles sont faiblement vascularisées et présentent une couleur blanche car elles contiennent très peu de myoglobines et de mitochondries. Elles utilisent la glycolyse anaérobie comme source d'énergie principale, on y trouve donc une forte concentration en glycogène.

I.5 Régénération

Chez l'homme, la pratique d'un exercice physique engendre l'apparition de lésions dans la fibre musculaire. Ces lésions sont indispensables à la croissance musculaire. Les myocytes détruits vont libérer leur contenu dans le milieu extracellulaire et ainsi déclencher un processus inflammatoire en cascade. La libération en cascade de signaux de l'inflammation va notamment permettre le recrutement des cellules satellites, actrices majeures de la construction musculaire. Ce sont les cellules progénitrices de la myofibre. Elles vont subir plusieurs étapes de différenciation pour devenir les myoblastes qui prendront place dans les myofibres. Ce processus contenant des étapes de multiplication cellulaire, il engendre la multiplication et le développement de nouvelles fibres, plus grosses et plus résistantes que leurs prédécesseuses. (20)

I.5.1 Trois étapes de la régénération

La régénération musculaire se divise en trois étapes distinctes : l'apparition d'une lésion, la phase dégénérative et la phase régénératrice.

I.5.1.1 Lésion musculaire

La pratique d'une activité physique intense, et en particulier d'un entraînement en résistance, va provoquer de nombreuses lésions musculaires. Ces lésions sont caractérisées par la rupture de fibres musculaires. La déchirure des sarcolemmes entourant les myofibrilles libère des protéines musculaires intracellulaires dans le milieu extracellulaire, engendrant une augmentation de leur taux sérique et stimulant ainsi la dégénérescence et la nécrose de la fibre. (21)

I.5.1.2 Dégénérescence et nécrose des fibres musculaires lésées

Les molécules musculaires intracellulaires libérées lors de la lésion du sarcolemme sont, entre autres, la créatine kinase et les ions calciums provenant du réticulum sarcoplasmique. L'augmentation de la concentration sérique en calcium a un rôle majeur dans la régénération musculaire, elle est à l'origine d'une protéolyse musculaire calcium-dépendante. Le calcium va en effet activer des protéases appelées calpaïnes qui vont cliver les protéines myofibrillaires et cytosoliques.

Parallèlement, la rupture des sarcolemmes va induire la libération de facteurs activant les cellules inflammatoires résidant dans le muscle. Ces cellules vont recruter les cellules inflammatoires circulantes grâce à des signaux chimiotactiques. On observe ainsi une augmentation significative de cellules immunitaires avec un envahissement du muscle par les neutrophiles dans les 1 à 6 heures puis par les macrophages 48 h après la lésion. Les macrophages vont phagocyter les débris engendrés par la lyse cellulaire et activer des cellules impliquées dans la régénération musculaire. (21)

I.5.1.3 Régénération et myogenèse

Les cellules clés de la régénération musculaire sont les cellules satellites. On les retrouve, quiescentes, entre les myofibrilles et leurs membranes basales accolées (*Figure*

2). Ces progéniteurs myogéniques vont être activés par plusieurs mécanismes en réponse à une lésion musculaire. Certaines molécules libérées par les macrophages ainsi que les facteurs solubles provenant du tissu conjonctif semblent avoir un rôle clé dans l'activation des cellules satellites. Cette étape d'activation précède l'étape de différenciation, aboutissant à la transformation des cellules satellites en précurseurs myogéniques, aussi appelés myoblastes, puis en myocytes. Ce sont les myocytes qui fusionneront avec les fibres endommagées pour former de nouvelles myofibres multinuclées. Ces dernières disposent de caractéristiques histologiques qui leurs sont propres, elles sont de petits calibres, leurs noyaux sont centraux et sont le siège d'une synthèse protéique élevée, ce qui leur confère un pH basophile. Par la suite ces myofibres augmenteront en taille et verront leurs noyaux migrer vers la périphérie. Les cellules satellites n'ayant pas été activées restent associées aux myofibres dans un état quiescent indifférencié. (21)

I.5.2 Action de la myostatine

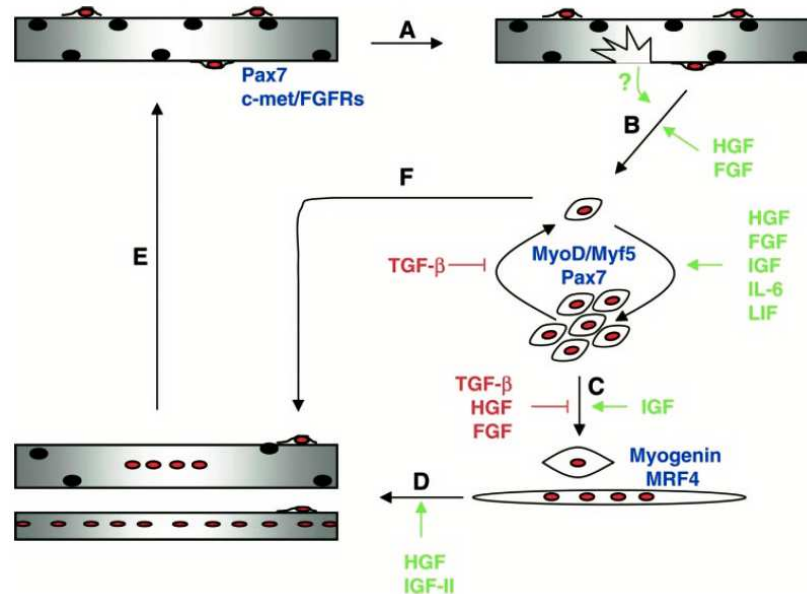


Figure 14 : Représentation schématique des événements moléculaires régulant la régénération du muscle squelettique (21)

Comme nous venons de voir précédemment, la régénération du muscle squelettique est un processus qui implique l'activation des cellules satellites. Après l'endommagement de la myofibre (Figure 14 A), des cellules satellites quiescentes sont

activées pour entrer dans le cycle cellulaire, proliférer (*Figure 14 B*) et ainsi se différencier en myoblastes puis en myocytes (*Figure 14 C*) avant de fusionner avec les myofibres endommagés (*Figure 14 D*). Les myofibres nouvellement formées vont croître pour ressembler aux myofibres originales (*Figure 14 E*). Un sous-ensemble de myoblastes revient à l'état de repos pour reconstituer le pool de cellules satellites pour une réparation musculaire ultérieure (*Figure 14 F*). La plupart de ces étapes sont régulées positivement ou négativement par des facteurs de croissance sécrétés. Ces facteurs de croissance sont des protéines appartenant au groupe des cytokines. Nous trouvons parmi elles le facteur de croissance des hépatocytes (*Hepatocyte Growth Factor*, HGF), les facteurs de croissance des fibroblastes (*Fibroblast Growth Factor*, FGFs), les facteurs de croissance ressemblant à l'insuline (*Insulin-like Growth Factor*, IGF), les interleukines 6 (IL-6) et les facteurs de croissance transformants beta (*Transforming Growth Factor beta*, TGF- β) dont fait partie la myostatine. Les TGF- β et donc la myostatine inhibent la différenciation terminale des cellules satellites. (21)

I.5.2.1 Généralités

La myostatine (MSTN) ou GDF8 (pour *growth and differentiation factor 8*) est un membre de la superfamille des facteurs de croissance transformants beta (TGF- β) sécrété naturellement par les cellules musculaires squelettiques au cours du développement et à l'âge adulte (22). Elle agit en inhibant la différenciation terminale de la cellule qui l'a synthétisée, on aura donc une action inhibitrice autocrine de la croissance du muscle squelettique ; ou de cellules adjacentes, on parlera alors d'action inhibitrice paracrine de la croissance musculaire.

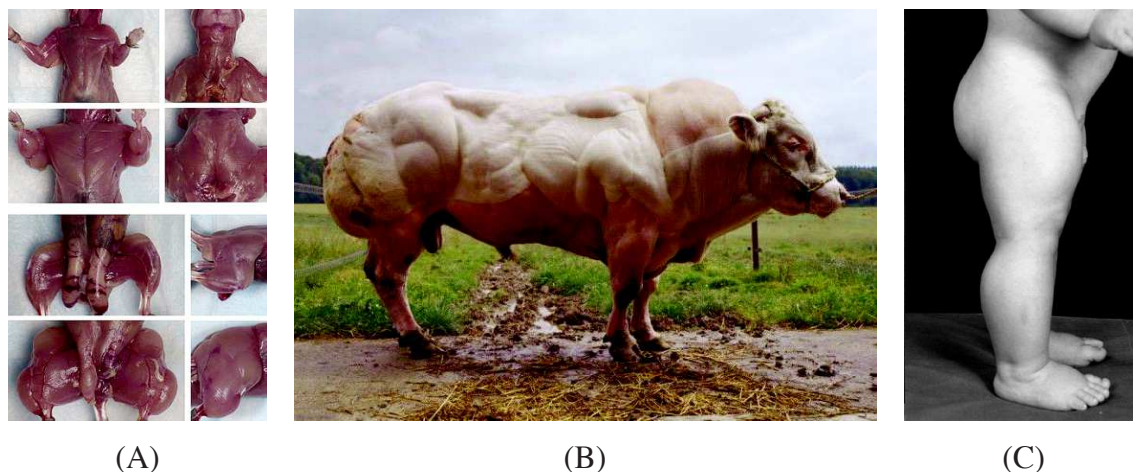


Figure 15 : Conséquences phénotypiques d'un déficit d'action de la myostatine chez des souris (A), un bovin (B) et un enfant (C)

Cette cytokine a été découverte en 1997 par McPherron, Lawler et Lee après la mise en évidence d'une augmentation importante et généralisée de la masse musculaire squelettique chez des souris porteuses d'une mutation du gène de la myostatine (*Figure 15 A*). On observe ainsi une hyperplasie et une hypertrophie des fibres musculaires chez ces souris (23). Par la suite plusieurs études ont démontré que des mutations naturelles du gène de la myostatine étaient responsables du phénotype de double musculature chez les bovins (*Figure 15 B*) (24)(25)(26)(27). En 2004 un cas humain de blocage de l'activité de la myostatine suite à une mutation génétique a été découvert chez un enfant en Allemagne (*Figure 15 C*). Cet enfant présentait une musculature démesurée comparativement aux enfants de son âge (28). Ces données suggèrent que la myostatine est un déterminant génétique de la masse musculaire squelettique.

I.5.2.2 Structure

Une étude menée par Gonzalez-Cadavid *et al.* en 1998 a permis de décrire l'organisation génomique et la cartographie chromosomique du gène de la myostatine humaine. Ce gène d'une taille de 7033 paires de bases est situé sur le chromosome 2 dans la région 2q33.2 (29), il comprend 2 introns et 3 exons codant respectivement pour 125, 124 et 126 aa. Cette étude a aussi montré que la transcription de ce gène en un ARNm de 3,1 Kb, et donc la synthèse de myostatine, est exclusive aux muscles squelettiques chez l'homme (*Figure 16*) (30).

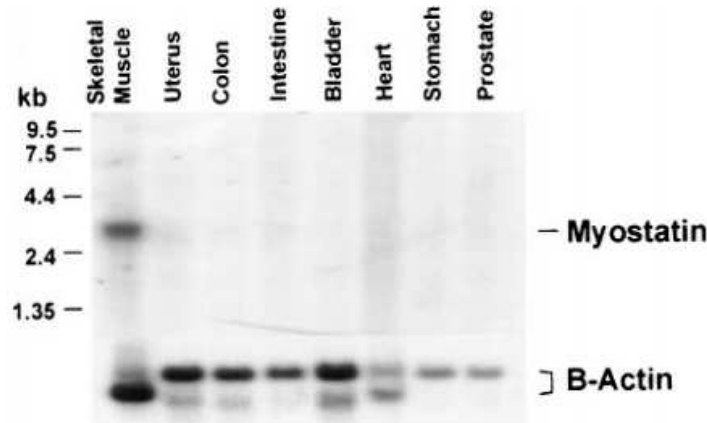


Figure 16 : Présence de l'ARNm de la myostatine dans différents organes humains (30)

La traduction de cet ARNm dans le réticulum endoplasmique de la cellule donne donc naissance à un précurseur biologiquement inactif de 375 aa. Ce précurseur est transporté dans l'appareil de Golgi par la latent transforming growth factor- β -binding protein-3 (LTBP-3) (31). Il est composé de trois domaines distincts : un peptide signal de 24 aa, un domaine propeptidique N-terminal et un domaine C-terminal donnant naissance au ligand actif. L'activation de la myostatine nécessite deux clivages protéolytiques de la protéine précurseur. Le premier clivage est effectué par les enzymes de la famille des furines qui éliminent le peptide signal, il a lieu soit dans l'appareil de Golgi soit dans le milieu extracellulaire après excrétion du précurseur. Deux monomères issus de ce clivage vont se lier par un pont disulfure pour former un dimère appelé myostatine latente. Le second clivage par la métalloprotéinase matricielle BMP1/Tolloïde se produit au niveau d'une séquence d'acides aminés RSRR (Arg-Ser-Arg-Arg) située entre les acides aminés 240 et 243 à partir de l'extrémité N-terminale de chaque monomère. Ce clivage libère les deux domaines C-terminaux liés par un pont disulfure dans le milieu extracellulaire, formant ainsi une protéine de 12,400 Da, c'est la myostatine mature (32).

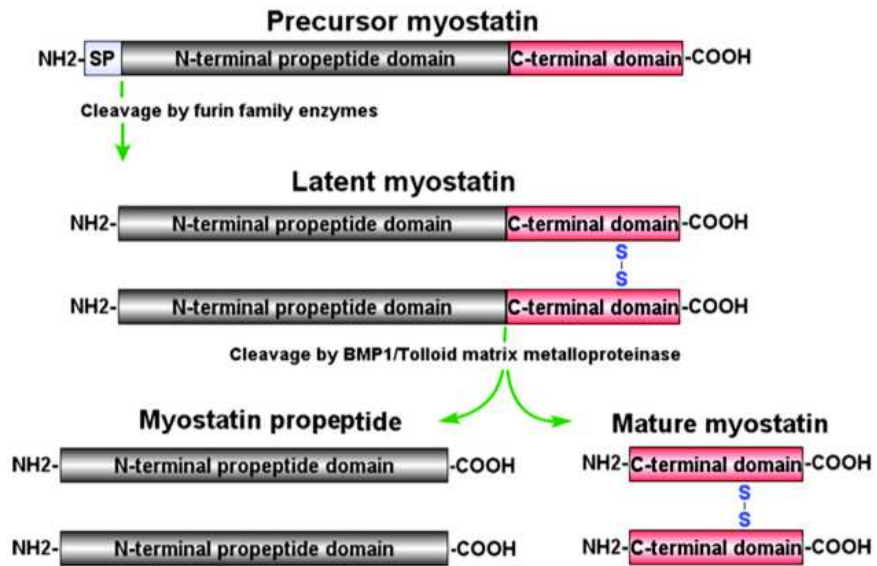


Figure 17 : Traitement protéolytique de la protéine de myostatine (32)

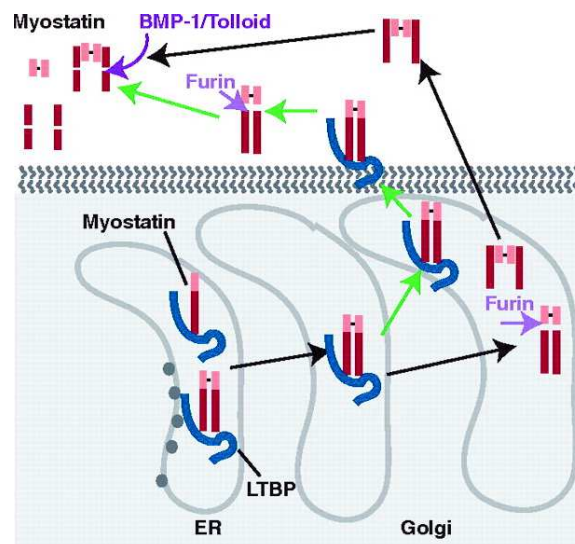


Figure 18 : Maturation et excréation de la myostatine (31)

Comme tous les membres de la famille des TGF, la structure tertiaire de la myostatine mature présente un pli constitué de deux monomères se réunissant de manière anti-parallèle pour former un dimère lié par un pont disulfure avec quatre surfaces distinctes : deux sites convexes de liaison aux récepteurs de type II et deux sites concaves de liaison aux récepteurs de type I (Figure 19 A). Les récepteurs de type I et II sont des récepteurs transmembranaires sérine/thréonine kinase présents à la surface des cellules musculaires. Leur activation provoquera le déclenchement de deux cascades

réactionnelles distincts, représentant deux les voies de signalisation de la myostatine et contribuant à l'action inhibitrice de la cytokine. Les sites de liaisons convexes et concaves de la myostatine sont également utilisés par les molécules de la famille des follistatines pour se lier à la myostatine et ainsi inhiber l'activité de cette dernière en empêchant sa fixation à ses récepteurs (*Figure 19 C*). Cette famille contient des membres tels que la follistatine (Fst) et la follistatine-like de type 3 (Fstl3) (*Figure 19 B*) (33).

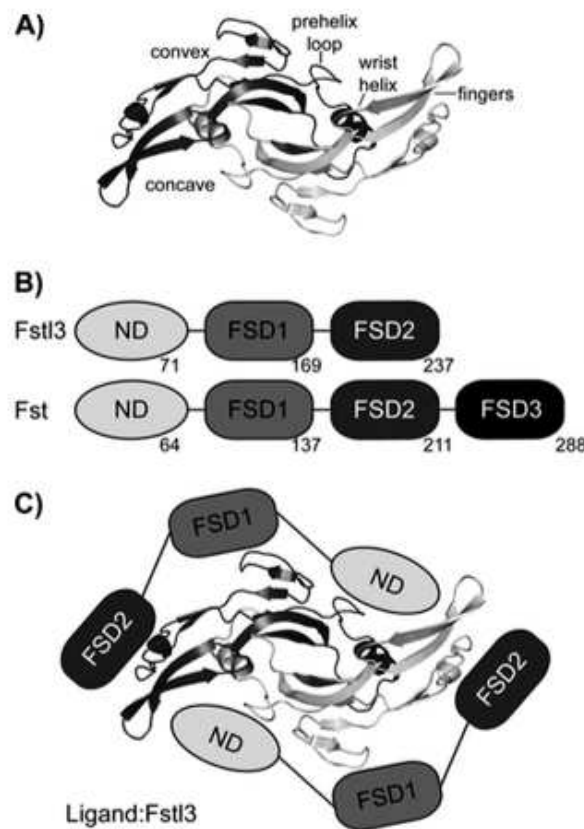


Figure 19 : Architecture de la myostatine et liaison avec les molécules de la famille des follistatines (33)

I.5.2.3 Voies de signalisation

La liaison de la myostatine à ses récepteurs entraîne le déclenchement de deux voies de signalisations distinctes : la voie Smad et la voie non-Smad (*Figure 20*).

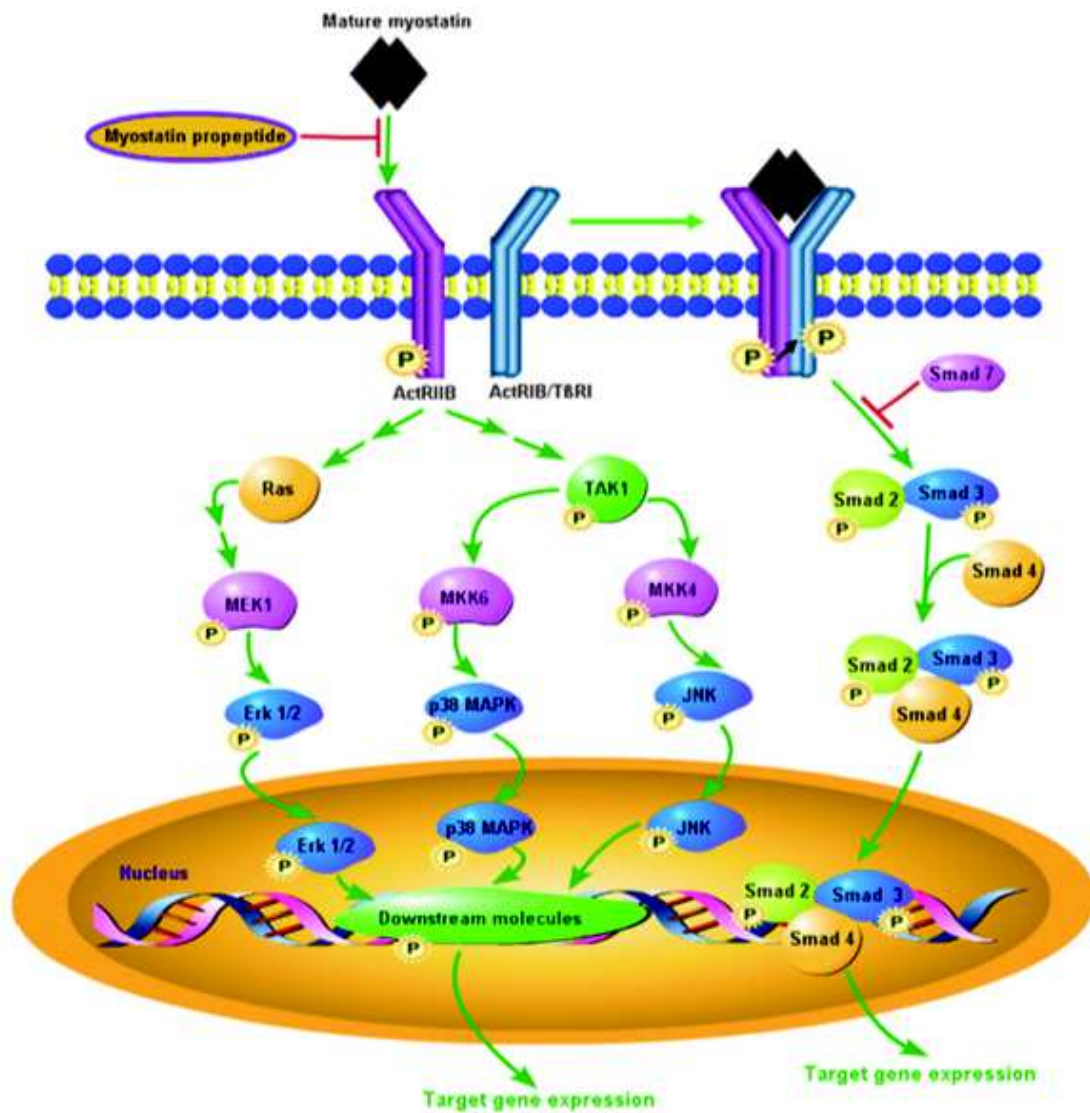


Figure 20 : Voies de signalisation de la myostatine (32)

Dans la voie Smad la transduction du signal TGF- β commence avec la liaison du ligand à son récepteur sérine/thréonine kinase de type II. L'association de ce récepteur (ActRIIB dans le cas de la myostatine) avec un récepteur sérine/thréonine kinase de type I (ActRIB ou T β R1 dans le cas de la myostatine) donne naissance à un complexe transmembranaire hétérotétramérique avec le dimère de myostatine et provoque la phosphorylation du récepteur de type I. ActRIB ainsi activé permet la phosphorylation des Smads 2 et 3 qui vont alors se lier entre eux pour former un dimère, puis avec Smad 4 pour constituer un trimère. Ce trimère entre dans le noyau du myocyte pour inhiber la transcription des facteurs de croissance de la famille des MRF (*Myogenic Regulatory Factors*) dont font partie MyoD, Myf-5, la myogénine et MRF-4, tous les quatre impliqués dans la réparation des fibres musculaires grâce à leur action stimulatrice de la

différentiation cellulaire (*Figure 14*) (20). L'action du complexe Smad 2/3/4 conduit également à l'augmentation de l'expression de Smad 7, permettant ainsi un rétrocontrôle négatif en inhibant la phosphorylation d'ActRIB (32).

La voie non-Smad regroupe les voies de signalisation de la myostatine ne faisant pas intervenir les Smad. Dans cette voie, seul les récepteurs sérine/thréonine kinase de type II (ActRIIB) sont impliqués. La liaison de la myostatine à ce récepteur conduit à la production intracellulaire de Erk 1/2, p38 MAPK et JNK. Ces trois facteurs régulent négativement l'expression de gènes impliqués dans la croissance musculaire, ils conduisent ainsi à l'inhibition de la prolifération et de la différenciation myoblastique. Erk 1/2 est issu de la cascade Ras-MEK1, p38 MAPK de la cascade TAK1-MKK6 et JNK de la cascade TAK1-MKK4 (32).

I.5.2.4 Effets

Comme les phénotypes présentés dans la *Figure 15* le montrent, l'absence d'action de la myostatine au niveau génétique entraîne une croissance musculaire excessive (22-26). En effet, la myostatine module l'expression de gènes impliqués dans la différenciation des cellules satellites et la prolifération des myocytes, elle n'a cependant aucun rôle dans la stimulation de l'apoptose des cellules musculaires.

Une étude menée en 2011 par McFarlane *et al.* (34) a permis de mettre en évidence l'action inhibitrice de la prolifération myoblastique de la myostatine. Cette étude montre que la myostatine régule à la hausse l'expression de la protéine p21, agissant comme inhibiteur de la kinase cycline-dépendante Cdk2. Cette cycline permettant le passage du cycle cellulaire de la phase G1 à la phase S, la myostatine bloque ainsi le cycle cellulaire en phase G1, ce qui diminue considérablement le nombre de cellules myoblastiques en phase S.

Une autre étude menée en 2002 par Langley *et al.* (35) a étudié les conséquences de la diminution de production des facteurs de croissance musculaire de la famille des MRF médiée par la voie Smad. Cette étude montre que, dans un premier temps, la déplétion des facteurs MyoD et Myf5 entraîne une diminution de la différenciation myogénique des cellules satellites en myoblastes. Dans un deuxième temps, la déplétion

des facteurs MyoD et Myf5 entraîne une diminution de l'activation de la myogénine et de MRF4, bloquant ainsi la différenciation terminale des myoblastes en myocytes et donc la fusion de ces derniers aux myofibres endommagées (21).

CHAPITRE II : LES RECEPTEURS PPARs

II.1 Généralités sur les récepteurs nucléaires

Les récepteurs nucléaires sont une famille de protéines qui se lient à l'ADN sur la région promotrice des gènes pour augmenter ou réprimer leur transcription en ARN messagers. Ce sont des facteurs de transcription activés par des ligands lipophiles tels que les hormones circulantes, des médiateurs synthétisés par la cellule ou les métabolites cytosoliques d'un médiateur extracellulaire.

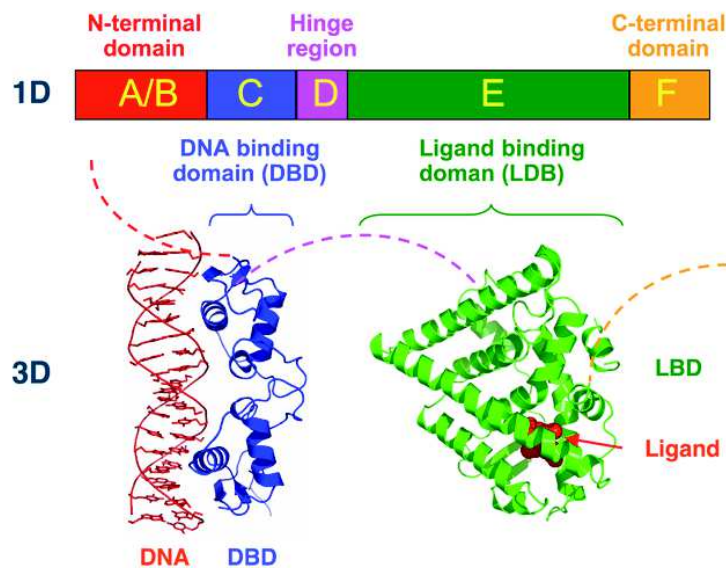


Figure 21 : Structure protéique des récepteurs nucléaires (36)

La structure de ces récepteurs est subdivisée en 6 domaines distincts, notés de A (à l'extrémité N-terminale) à F (à l'extrémité C-terminale) :

- A/B Domaine de régulation N-terminal : Contient la fonction d'activation 1 (AF-1) dont l'action est indépendante de la présence du ligand.
- C Domaine de liaison à l'ADN (DBD) : Domaine contenant deux doigts de zinc qui se lient à des séquences spécifiques de l'ADN appelés éléments de réponse aux hormones (HRE).
- D Région charnière : Domaine flexible qui relie le DBD avec le LBD. Il influence le trafic intracellulaire et la distribution subcellulaire.
- E Domaine de liaison du ligand (LBD) : Composé de trois hélices alpha parallèles, encadrées par deux hélices alpha d'un côté et trois de l'autre. Il se lie

également aux protéines coactivatrices et corépressives. Ce domaine contient la fonction d'activation 2 (AF-2) dont l'action est dépendante de la présence du ligand.

- F Domaine C-terminal : Séquence très variables entre les différents récepteurs nucléaires.

Les domaines A/B, C et E sont structurellement stables alors que les domaines D et F sont flexibles et désordonnés (37).

En fonction des analogies de structures primaires, les récepteurs nucléaires peuvent être divisés en 6 sous-familles issues d'un même gène ancestral ayant divergé au cours de l'évolution. Ces sous-familles sont chacune apparentées à un type de récepteurs dont elles portent le nom : Thyroïde Hormone Receptor-like (*sous-famille 1* dont font partie les PPARs), Retinoid X Receptor-like (*sous-famille 2*), Estrogen Receptor-like (*sous-famille 3* dont font partie les récepteurs stéroïdiens), Nerve Growth Factor IB-like (*sous-famille 4*), Steroidogenic Factor-like (*sous-famille 5*), Germ Cell Nuclear Factor-like (*sous-famille 6*) (36).

II.2 Mécanisme d'action

Les récepteurs nucléaires forment un complexe avec leur ligand afin de moduler la transcription d'ARN messager en se fixant à l'ADN sur la séquence HRE. Ces récepteurs peuvent être répartis en 4 classes selon leurs spécificités d'action.

II.2.1 Interaction ligand-récepteur

L'interaction entre le récepteur et son ligand fait souvent intervenir la participation de co-régulateurs (co-activateurs et co-répresseur). Il existe deux modes d'action différents à ce niveau.

II.2.1.1 Récepteurs stéroïdiens

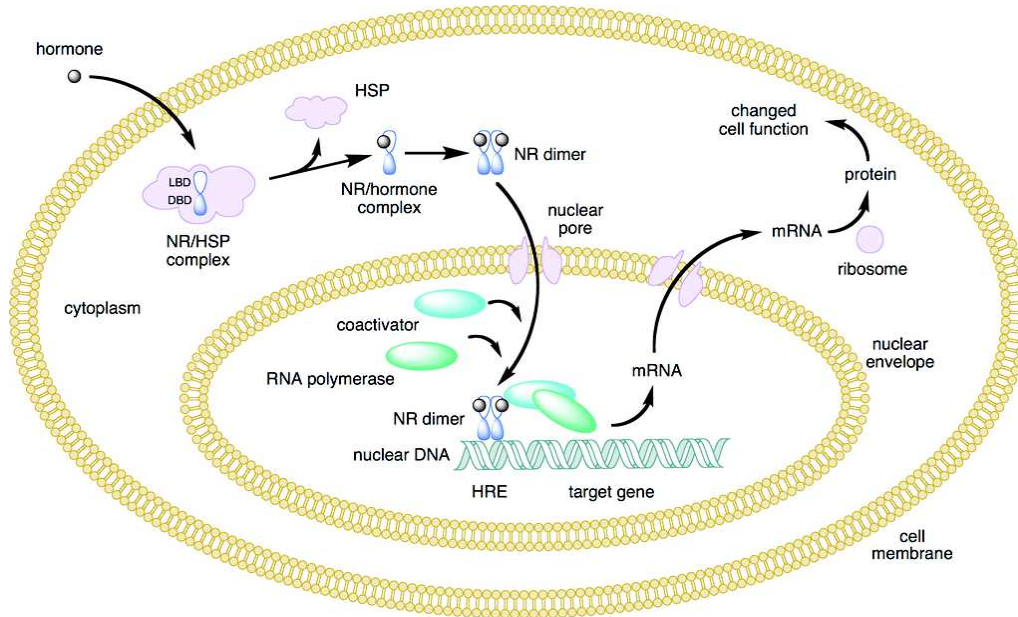


Figure 22 : Mécanisme d'action des récepteurs stéroïdiens (36)

Le premier mode d'action est celui des récepteurs stéroïdiens. En l'absence de ligand l'aporrécepteur est maintenu dans le cytoplasme sous forme inactive par association à des protéines de choc thermique HSP (*Heat Shock Proteins*) ou protéines chaperonnes. HSP90 et HSP70 sont les principales protéines chaperonnes, elles masquent le signal de localisation nucléaire. La fixation du ligand au récepteur va le faire changer de conformation et ainsi relarguer les protéines HSP et démasquer le signal de localisation nucléaire. L'holorécepteur va alors migrer dans le noyau pour se fixer sur la séquence HRE sous forme d'homodimère (38).

II.2.1.1 Récepteurs non stéroïdiens

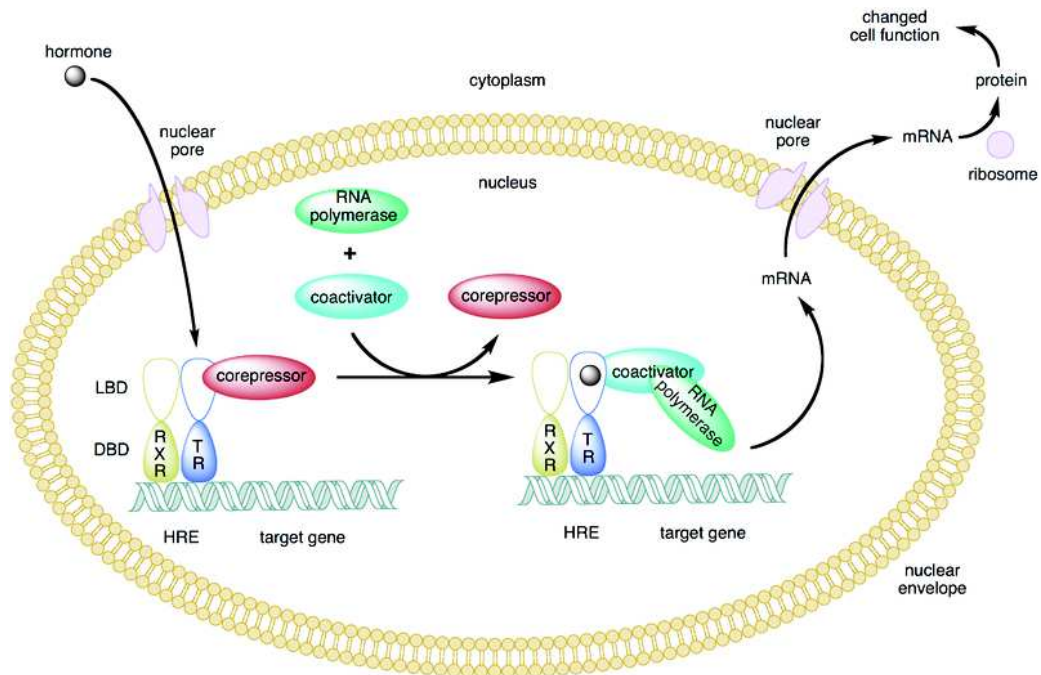


Figure 23 : Mécanisme d'action des récepteurs non stéroïdiens (36)

Le second mode d'action est celui des récepteurs non stéroïdiens. Dépourvus de protéines chaperonnes, ces récepteurs sont toujours localisés dans le noyau. Les récepteurs sont fixés à la séquence HRE sous forme d'hétérodimères et sont, à ce stade actifs grâce au recrutement de co-régulateurs, les aidant à modifier l'activité transcriptionnelle des gènes. La fixation du ligand provoque un changement conformationnel entraînant un échange de co-régulateurs et inversant ainsi la modification initiale de l'activité transcriptionnelle du gène régulé (38).

II.2.2 Interaction récepteur-ADN

Tout comme l'interaction ligand-récepteur, l'interaction récepteur-ADN laisse apparaître quelques divergences entre les mécanismes d'action des différents récepteurs nucléaires. Nous dénombrons deux niveaux de divergences à ce stade : le récepteur peut agir sous forme dimérisées (homodimère ou hétérodimère), auquel cas il interagit avec

deux demi-éléments de séquences HRE, dont la répétition peut être inversée ou directe, ou au contraire agir sous forme de monomère.

Dans le cas où le récepteur agit sous forme de dimère, l'élément de réponse HRE est composé de 2 demi-éléments hexanucléotidiques identiques répétés (dans la plupart de cas AGAACA ou AGGTCA), séparés par un nombre variable de nucléotides. Pour les récepteurs stéroïdiens ces 2 demi-éléments sont chacun présents sur un brin d'ADN différent, on parle de répétitions inversées ou palindromes. Pour les récepteurs non stéroïdiens ils sont présents sur le même brin d'ADN, on parle de répétition directe.

Comme nous venons de le voir précédemment, à chaque demi-élément se fixe un monomère du récepteur nucléaire. Si ces deux monomères sont identiques on parle d'homodimère, c'est le cas des récepteurs stéroïdiens et de quelques récepteurs non stéroïdiens dit « orphelins ». Si ces deux monomères sont différents, on parle d'hétérodimère, c'est le cas de la plupart des récepteurs non stéroïdiens qui se dimérisent avec le récepteur X des rétinoïdes (RXR). On référence aussi quelques récepteurs orphelins qui agissent sous forme de monomères.

Ces différentes interactions récepteur-ADN permettent de classer les récepteurs nucléaires en 4 classes :

- La classe I regroupe les récepteurs s'homodimérisant sur une répétition inversée. Ce sont les récepteurs stéroïdiens.
- La classe II regroupe les récepteurs s'hétérodimérisant sur une répétition directe. Ce sont les récepteurs non stéroïdiens, comprenant les récepteurs PPARs.
- La classe III regroupe les récepteurs orphelins s'homodimérisant sur une répétition directe.
- La classe IV regroupe les récepteurs orphelins monomériques (38).

II.3 Différents types de PPARs et leurs ligands endogènes et synthétiques

Les récepteurs activés par les proliférateurs de peroxyosomes (PPAR) sont des facteurs de transcription activés par des ligands. Ils font partie de la superfamille des récepteurs nucléaires. Les ligands de ces récepteurs ont comme caractéristiques

communes d'être lipophiles et de posséder un noyau aromatique, en général porteur d'une fonction acide carboxylique et d'autres substituants comme des halogènes. Il existe 3 isotypes majeurs de PPARs : PPAR α , PPAR γ , PPAR δ , tous trois codés par des gènes différents. En induisant sélectivement la transcription des protéines de la β -oxydation des acides gras, ces récepteurs stimulent la production et la croissance des peroxysomes (39), ils jouent ainsi un rôle essentiel dans le métabolisme énergétique (40). Ils régulent la transcription de gènes cibles en se fixant à une séquence d'ADN appelée élément de réponse aux proliférateurs de peroxysomes (PPRE). Ces éléments sont constitués de séquences hexamériques AGGTCA séparées par un ou deux nucléotides. La liaison au PPRE n'est possible qu'après formation d'un hétérodimère avec les récepteurs X de l'acide rétinoïque (RXR) (41).

II.3.1. Mécanismes d'action des PPARs

A l'état inactif, les PPARs forment un complexe avec des protéines co-répresseurs à activité histone désacétylase. Après fixation de son ligand, le récepteur se dissocie de ce co-répresseurs et recrute un co-activateur à activité histone acétylase. Les PPARs peuvent alors réguler la transcription des gènes cibles par deux mécanismes différents : la transactivation et la transrépression.

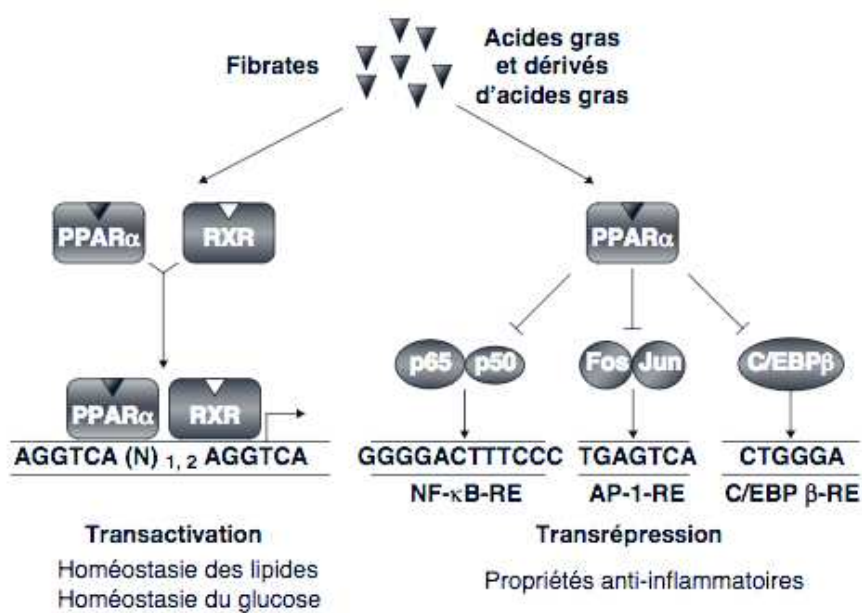


Figure 24 : Mode d'action des PPAR α (42)

II.3.1.1. Transactivation

L'activité de transactivation est dépendante de la fixation à l'ADN. Le récepteur agit en se fixant sur un élément de réponse PPRE après dimérisation avec un récepteur X de l'acide rétinoïque (RXR). La fixation de l'hétérodimère PPAR-RXR sur l'élément PPRE induira la transcription de gènes impliqués dans l'homéostasie des lipides et du glucose. Comme les PPAR, le RXR existe sous trois isoformes distinctes : le RXR- α , le β et le γ , qui sont activés par leur agoniste endogène, l'acide 9-cis rétinoïque. Tout comme les agonistes PPAR, les agonistes RXR peuvent activer le complexe PPAR-RXR (41).

II.3.1.2. Transrépression

L'activité de transrépression est indépendante de la fixation à l'ADN. Les PPAR transrépriment les voies de signalisation NF κ B, AP-1 et STAT1 pro-inflammatoires en interférant négativement avec des sous-unités de facteurs de transcription telles que p65 et c-Jun. Cette action confère donc une activité anti-inflammatoire au récepteur activé (42).

II.3.1.3. Ligands

Les trois types de récepteurs peuvent être activés par des acides gras et par leurs métabolites. Cela leur confère un rôle de détecteur de lipides. Les acides gras insaturés se lient aux trois sous-types de récepteurs alors que les acides gras polyinsaturés réagissent plus efficacement avec les PPAR γ .

Ligand	PPAR α	PPAR δ	PPAR γ
Acide eicosatétraénoïque	++	nd	nd
Acide docosatetraénoïque	+	+	+
Acide linoléïque	+	+	-
Acide arachidonique	+	+	+
Acides gras saturés (C6-C18)	+	+	nd
Prostaglandine J2	++	++	++
Prostaglandine I2	++	++	+
Prostaglandine A _{1/2}	++	++	+
Prostaglandine D ₂	++	+	+
Prostaglandines du groupe E	-	-	-
Prostaglandines du groupe F	-	-	-
Acide hydroxyéicosapentaénoïque (8-HEPE)	++	nd	nd
Acide hydroxyéicosatétraénoïque (8-HETE)	+++	-	+
Leucotriène B4	++	nd	nd
LDL oxydées	nd	nd	++

+++ activateurs agissant à des concentrations nanomolaires ; ++ à des concentrations micromolaires basses ; + à des concentrations micromolaires élevées ; - pas d'effet après liaison au récepteur ; nd : absence d'information

Figure 25 : Activateurs endogènes des PPARs (43)

II.3.2 structure des PPARs



Figure 26 : Superposition des structures de PPAR α (blanc), PPAR δ (magenta) et PPAR γ (cyan) (44)

Les trois isotypes du récepteur ont des structures très proches. Ils contiennent tous les trois les domaines A/B, C et E. Le domaine de régulation A/B, situé dans la région N-terminale, contient la fonction d'activation-1 (AF-1) dont l'activation est indépendante de la fixation du ligand. Le domaine C est celui qui se lie à l'ADN. Enfin le domaine de régulation E, situé dans la région C-terminale, contient la fonction d'activation-2 (AF-2) dont l'activation est dépendante de la fixation du ligand (41).

II.3.3 PPAR α (42)

II.3.3.1 Expression

Les récepteurs PPAR α sont principalement exprimés dans les tissus présentant une forte activité de catabolisme des acides gras : le foie, les muscles squelettiques et le cœur. On les retrouve aussi dans les entérocytes, les cellules immunitaires telles que les monocytes, les macrophages et les lymphocytes T, dans les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses. Ils ont donc un rôle majeur dans l'activation de l'oxydation mitochondriale et peroxysomale des acides gras.

II.3.3.2 Ligands

Les données cristallographiques du domaine de liaison à l'hormone (LBD) ont montré que la taille de cette poche permettait de lier un grand nombre de ligands.

- Naturels :

Les ligands naturels du récepteur PPAR α sont les acides gras insaturés ou saturés tels que l'acide palmitique, l'acide oléique, l'acide linoléique et l'acide arachidonique ainsi que certains eicosanoïdes issus de la dégradation par la lipoxycgénase de ces deux derniers.

- Synthétiques :

Les principaux ligands synthétiques de ce récepteur sont les fibrates. Ces médicaments sont utilisés dans le traitement des hypertriglycémies. Le fénofibrate active spécifiquement PPAR α alors que le bézafibrate active les trois isotypes de PPARs. Des ligands très spécifiques de PPAR α , tels que le GW7647 et le GW9578 ont été synthétisés ces dernières années.

II.3.3.3 Rôles physiologiques

En modulant la transcription de certains gènes, le récepteur PPAR α est capable de réguler le métabolisme des lipides et la réponse inflammatoire. Ces deux actions lui permettent de limiter le risque de développement de plaques d'athéromes.

Régulation du métabolisme des lipides et des lipoprotéines

- Foie et muscles :

Les récepteurs PPAR α régulent plusieurs gènes impliqués dans le métabolisme des lipides intracellulaires au niveau hépatique et musculaire :

- L'augmentation de l'expression de gènes impliqués dans le transport des acides gras induit la captation de ces derniers par les cellules.
- L'augmentation de l'expression de l'acyl-Coa synthétase induit l'estérification des acides gras en acyl-Coa.
- L'augmentation de l'expression des carnitine palmitoyltransférase CPT-I et CPT-II, enzymes modifiant les acides gras, favorise l'entrée des acides gras dans les mitochondries.
- L'augmentation de l'expression des enzymes mitochondriales impliquées dans la dégradation des acides gras favorise la β -oxydation de ces derniers.

L'activation de la transcription de ces gènes, favorisant tous la dégradation des acides gras, baisse significativement la concentration d'acides gras libres. Il en découle donc une diminution de la synthèse des VLDL dans les vaisseaux.

L'activation des récepteurs PPAR α entraîne une régulation de l'expression des lipoprotéines et agit ainsi sur la concentration en triglycérides et en HDL :

- L'augmentation de l'expression des apolipoprotéines constituant les HDL, apoA1 et apoAII, ainsi que l'augmentation de l'expression des enzymes impliquées dans la maturation de ces lipoprotéines favorisent la formation des HDL.
- Au niveau des macrophages, l'augmentation de la concentration en cholestérol libre, la diminution de la concentration en cholestérol estérifié ainsi que l'augmentation des transporteurs ABCA-1 et CLA-1/SR-BI favorisent l'efflux de cholestérol. L'augmentation hépatique de l'expression des accepteurs de cholestérol apoA1 favorise la formation de HDL dans la circulation sanguine.
- Par le biais de plusieurs actions au niveau hépatique, musculaire et cardiaques, les PPAR α permettent une diminution du nombre de triglycérides. L'augmentation de l'expression et de l'activité de la lipoprotéine lipase (LPL) permet l'hydrolyse des triglycérides circulants. La baisse de l'expression de la lipoprotéine apoCIII, qui est un constituant des particules riches en triglycérides ainsi qu'un inhibiteur de la LPL. Et enfin l'augmentation de l'expression de l'apoAV.

Les HDL ainsi formés retournent vers le foie pour éliminer le cholestérol.

Régulation de la réponse inflammatoire

Grace à son expression dans le foie, les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses, les macrophages et les lymphocytes, le récepteur PPAR α est capable de diminuer la réponse inflammatoire.

- Foie : La répression des voies de signalisation C/EBP- β et NF κ B par le récepteur PPAR α activé conduit à la diminution de l'expression de la protéine C réactive (CRP), du fibrinogène et de protéines de la phase aigüe.

- Cellules endothéliales : L'activation des PPAR α inhibe l'expression de molécules intervenant dans le recrutement des leucocytes. Il s'agit de MCP-1 (*monocyte-chemoattractant protein-1*), VCAM-1 (*vascular cell-adhesion molecule-1*) et

ICAM-1 (*intracellular adhesion molecule-1*). PPAR α inhibe aussi l'expression de l'endothéline-1, un peptide vasoconstricteur.

- Cellules musculaires lisses : La présence de PPAR α dans les cellules musculaires lisses de l'aorte va entraîner l'inhibition de la cyclo-oxygénase-2 (COX-2) ainsi que la diminution de la migration et de la prolifération de ces cellules. Le premier de ces deux phénomènes est la conséquence de la répression de la voie de signalisation NF κ B, induisant la diminution de la production d'interleukine-6 (IL-6).

- Macrophages : En plus de l'augmentation de l'efflux de cholestérol, l'activation de PPAR α au niveau des macrophages inhibe l'expression de plusieurs molécules de l'inflammation. Ces molécules sont :

- Le facteur tissulaire (TF), protéine impliquée dans les thromboses.
- La MMP-9 (*matrix métalloprotéinase-9*), protéine impliquée dans le remodelage de la matrice extracellulaire.
- Les cytokines pro-inflammatoires IL-6 et TNF α et donc la cyclo-oxygénase-2 (COX-2).

- Lymphocytes : La répression de la voie NF κ B par PPAR α diminue la production de l'interféron- γ (IFN- γ), de l'interleukine-2 (IL-2) et du TNF α par les lymphocytes.

II.3.4 PPAR γ

II.3.4.1 Expression

Les PPAR γ sont subdivisés en 4 isoformes exprimés chacun dans des organes différents :

- PPAR γ 1 sont exprimés dans le cœur, les muscles striés, le colon, les reins, le pancréas et la rate.
- PPAR γ 2 sont principalement exprimés dans le tissu adipeux.
- PPAR γ 3 sont exprimés dans les macrophages, le côlon et le tissu adipeux blanc.

- PPAR γ sont exprimés dans les cellules endothéliales (41).

II.3.4.2 Ligands

- Naturels :

Les acides gras et certains dérivés d'acides gras sont des ligands de faibles affinités pour les récepteurs PPAR γ . L'acide arachidonique et quelques autres eicosanoïdes ainsi que certains composants de LDL oxydés sont des ligands plus spécifiques de ces récepteurs.

- Synthétiques :

Les ligands synthétiques de PPAR γ étaient utilisés dans le diabète de type 2 pour améliorer la sensibilisation de la réponse à l'insuline chez les patients malades. Les principales molécules utilisées étaient les thiazolidinediones (ou glitazones) telles que la troglitazone, la rosiglitazone et le pioglitazone (42). En 1999, une molécule non-thiazolidinedione ayant une meilleure affinité pour les PPAR γ a été mise au point. Il s'agit du GW1929 (45).

II.3.4.3 Rôles physiologiques

Les principales conséquences de la régulation des gènes par les PPAR γ sont l'amélioration de la sensibilité des organes à l'insuline, la promotion de l'adipogenèse et un effet antiprolifératif sur certaines cellules cancéreuses.

Systeme immunitaire

- Cellules dendritiques : PPAR γ provoque l'activation et la migration des cellules dendritiques. Il stimule aussi l'absorption et la présentation des antigènes.

- Monocytes / macrophages : En réprimant l'expression des cytokines pro-inflammatoires TNF α , IL-1 et IL-6, les récepteurs PPAR γ exercent un effet anti-

inflammatoire. En inhibant ces cytokines ils empêchent leurs actions néfastes sur la réponse des organes à l'insuline ainsi que sur les cellules sécrétrices d'insuline, les cellules β des îlots de Langerhans. Les PPAR γ stimulent la différenciation des monocytes en macrophages.

Organes métaboliques

- Muscles squelettiques : En stimulant la réponse des muscles à l'insuline, les PPAR γ répriment le transport et l'oxydation musculaire des acides gras. Ce phénomène déplace le métabolisme énergétique cellulaire vers les voies utilisant le glucose (46).
- Pancréas : L'activation des PPAR γ potentialise l'action sécrétrice d'insuline par le glucose.
- Foie : Le stockage des lipides sera favorisé au dépend de celui des glucides. Les PPAR γ réprime l'expression des enzymes nécessaire à la glycogénogénèse (46).
- Adypocytes : Les facteurs de transcription C/EBP β et C/EBP δ sont activés par l'insuline et durant les premières étapes de l'adipogénèse et induisent l'expression de PPAR γ et de C/EBP α . Ces deux protéines organisent la différenciation des adypocytes et l'orientent vers la production d'adipocytes blanc, ayant pour fonction de stocker l'énergie. Le PPAR γ (et plus particulièrement PPAR γ 2) est un régulateur de l'adypogénèse, il induit l'expression de marqueurs spécifiques du tissu adipeux tels que la protéine aP2 (*adipocyte protéin 2*), la phosphoénolpyruvate carboxykinase, la lipoprotéine lipase (LPL), l'acyl-Coa synthétase. Il est aussi capable de réprimer l'expression de la leptine, hormone induisant la lipolyse et l'utilisation du glucose par les adypocytes (47). L'activation des récepteurs PPAR γ promeut aussi l'adipogénèse dans des cellules non adipogéniques telles que les fibroblastes NIH-3T3 (46).

Cerveau

La diminution de la production de molécules pro-inflammatoire par les cellules microgliales (cellules immunitaires du cerveau) a montré une efficacité des agonistes

PPAR γ dans le retardement du développement de la maladie d'Alzheimer et de la sclérose latérale amyotrophique (SLA ou maladie de Charcot) (41).

Cellules endothéliales

Les PPAR γ répriment l'expression des molécules vasculaires d'adhésion cellulaires VCAM-1 (*Vascular Cell Adhesion Molecule 1*) et des molécules d'adhésion intercellulaires ICAM-1 (*IntraCell Adhesion Molecule 1*). Cette action réduit l'accumulation des monocytes et des cellules musculaires lisses dans l'intima, ce qui a un effet bénéfique sur l'athérosclérose (47).

Rôles dans les cancers

L'induction du gène suppresseur de tumeur PTEN par les PPAR γ leur confère une activité anti-cancéreuse. Ils inhibent ainsi la prolifération des cellules cancéreuses dans les liposarcomes, les adénocarcinomes du sein, les carcinomes de la prostate, les cancers du pancréas, les cancers colorectaux, les cancers du poumon non à petites cellules, les cancers de l'estomac, les tumeurs gliales du cerveau. Malheureusement les thiazolidinediones n'ont pas pu être utilisées pour leurs effets anti-cancéreux car elles ont été retirées du marché dans les années 2010. Cette interdiction fait suite à la publication de plusieurs études épidémiologiques mettant en évidence une augmentation du risque de cancer de la vessie et du risque cardiovasculaire chez les patients traités par ces molécules (41).

II.3.5 PPAR δ

II.3.5.1 Expression

L'expression de PPAR δ est ubiquitaire, on retrouve ce récepteur dans le muscle squelettique, les adipocytes, les macrophages, les cellules endothéliales, les poumons, le cerveau et la peau.

II.3.5.2 Ligands

- Naturels :

Les ligands naturels du récepteur PPAR δ sont certains acides gras alimentaires et une prostaglandine endogène, la prostaglandine A1. Les acides gras sont soit saturés soit polyinsaturés, il s'agit des acides linoléique, oléique, arachidonique, eicosapentanoïque et docosahexanoïque.

- Synthétiques :

Plusieurs ligands synthétiques ont démontré leur affinité pour PPAR β/δ . Les ligands exerçant une action agoniste sont :

- La Carbaprostacycline, un analogue synthétique de la PGI₂
- L'Iliprost, un analogue de la prostacycline
- Compound F, L165041, GW501516, GW0742, des dérivés de l'acide phénoxyacétique
- KD2010 et MBX8025

Le GSK0660 est quant à lui un antagoniste synthétique du récepteur (48).

II.3.5.3 Rôles physiologiques

- Muscles squelettiques :

L'activation des récepteurs PPAR δ localisés dans les muscles striés squelettiques entraîne des modifications phénotypiques et métaboliques des fibres musculaires.

La liaison du récepteur activé au coactivateur PGC-1 α stimule la transcription de gènes responsables de la conversion des fibres glycolytiques de type II en fibres oxydatives de type I. Ce processus s'opère physiologiquement chez les athlètes s'entraînant en endurance. On retrouve d'ailleurs chez eux une concentration musculaire plus élevée en PPAR δ et en PGC-1 α .

L'activation de PPAR δ par les acides gras stimule l'expression de CD36. Cette molécule étant un transporteur membranaire des acides gras, elle facilite l'entrée des acides gras dans le myocyte et provoque ainsi un rétrocontrôle positif.

A l'intérieur des cellules musculaire les acides gras sont couplés au coenzyme A avant d'être transformés en acyl-Coa grâce à l'énergie fournie par une molécule d'ATP. Avec l'aide de la carnitine, cette acyl-Coa sera transporté dans la matrice mitochondriale afin d'être oxydé.

Toujours au sein du myocyte, le récepteur PPAR δ stimule la transcription du gène de la PDK4, protéine inactivant par phosphorylation le complexe pyruvate déshydrogénase (PDC). En inhibant cette protéine, PPAR δ réduit l'oxydation des glucides et oriente ainsi le métabolisme cellulaire vers les filières utilisant les acides gras. La stimulation de l'expression de la carnityl-palmitoyl transférase par PPAR δ , tend elle aussi à augmenter l'oxydation des acides gras (49).

- Vaisseaux sanguins :

En augmentant l'expression du gène de la prostaglandine I2 (PGI2), les PPAR δ tendent à diminuer l'entrée en apoptose des cellules endothéliale en réponse à une hypoxie, des endotoxines bactériennes ou des cytokines pro-inflammatoires. Cette action diminuera le risque de thrombogénèse et d'athérosclérose.

En stimulant l'expression du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VGEF-A, *Vascular Endothélium Growth Factor A*) et de son récepteur, les PPAR δ provoque une augmentation de l'angiogenèse au niveau musculaire. Couplée à l'augmentation du nombre de fibres de type I, cette action favorise très fortement l'utilisation musculaire de l'oxygène sanguin.

La stimulation des récepteurs PPAR δ au niveau des monocytes et des macrophages induit l'expression de molécules allant à l'encontre du développement des plaques d'athérome. L'augmentation de l'expression d'ABCA1 (*ATP-Binding Cassette A1*), un transporteur membranaire du cholestérol non estérifié et des phospholipides,

engendre un efflux de ces molécules dans la circulation sanguine. Elles pourront alors se coupler pour former des HDL, qui migreront vers le foie pour être détruits. Les PPAR δ exerce donc un rôle protecteur dans les dyslipidémies. La répression de gènes codant pour les molécules d'adhésion des monocytes VCAM, ICAM et MCP1, pour des cytokines pro-inflammatoire et du gène codant pour la molécule stabilisatrice de plaque MMP-9, tend à diminuer le risque d'athérosclérose (48).

CHAPITRE III : MEDICAMENTS AFFECTANT LE MUSCLE STRIE SQUELETTIQUE

La plupart des agents pharmacologiques mimant les conséquences physiologiques d'une activité physique stimulent l'activité mitochondriale. Ces médicaments agissent sur différents mécanismes moléculaires intracellulaires. Certains stimulent des processus biologiques activateurs alors que d'autres répriment des processus inhibiteurs. Nous détaillerons successivement ces deux modes d'action dans ce chapitre.

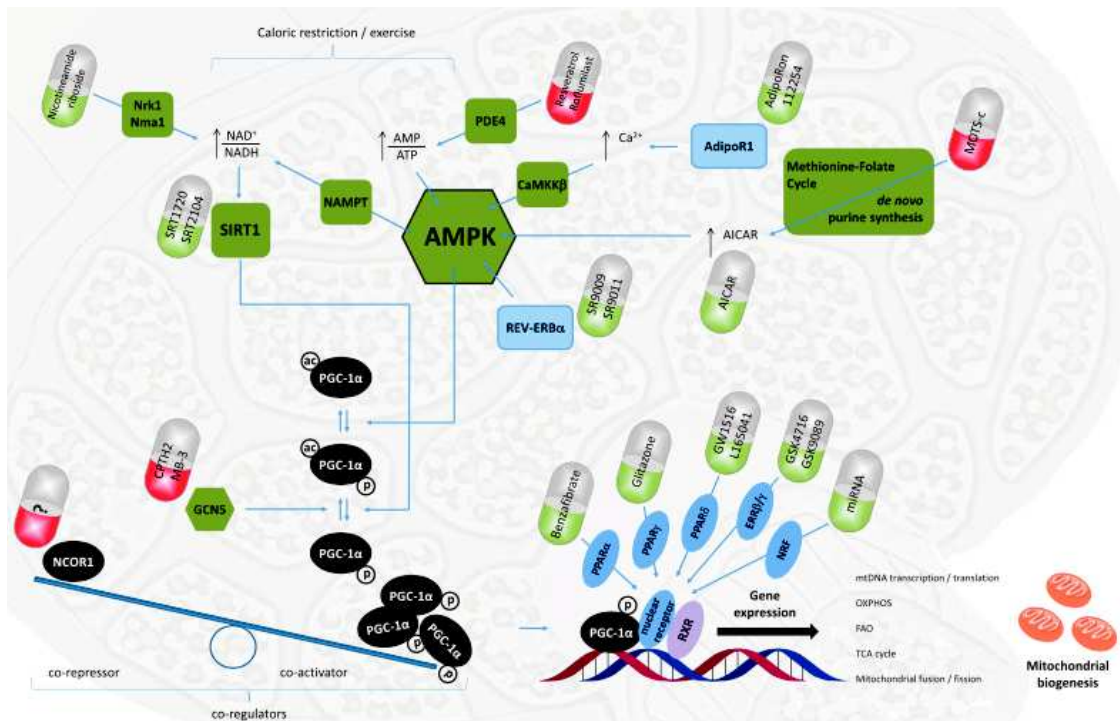


Figure 27 : Cibles médicamenteuses et leurs ligands pouvant influencer sur la biogénèse mitochondriale (50)

Dans des conditions physiologiques la biogénèse mitochondriale est stimulée par l'exercice d'endurance et la restriction calorifique. Certaines études ont cherché à comprendre les mécanismes intracellulaires à l'origine de cette stimulation dans le but de synthétiser des molécules capables de les imiter. Il a notamment été démontré que le rapport AMP/ATP était augmenté dans des conditions de stress énergétique. En réponse à cette augmentation la cellule va augmenter la production d'AMPK (*AMP-activated protein kinase*). Cette enzyme va notamment phosphoryler le coactivateur de PPAR γ ,

PGC-1 α (51). L'augmentation de la concentration cellulaire en AMPK est responsable de l'activation de PGC-1 α car elle stimule indirectement sa désacétylation.

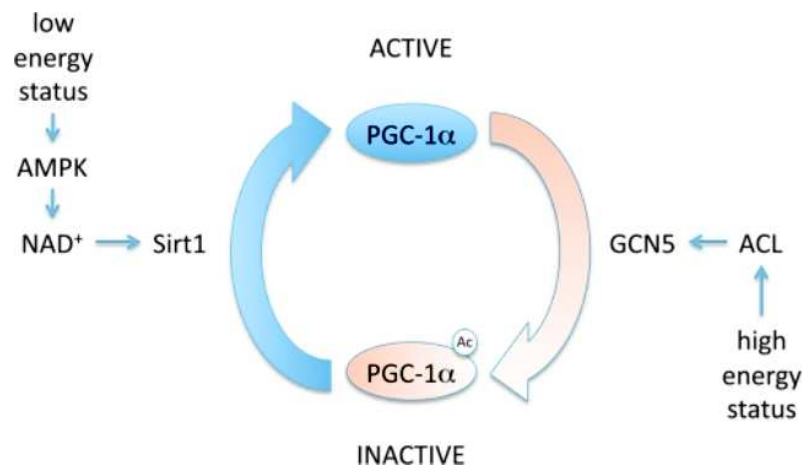


Figure 28 : Mécanismes responsables de l'activation et de l'inactivation de PGC-1 α (51)

Dans des situations de faible énergie, l'activité de l'AMPK augmente la concentration en protéine NAD⁺, ce qui stimule l'activité de désacétylation de la sirtuine 1 (SIRT1) et donc l'activation de PGC-1 α . En revanche lorsque les réserves énergétiques sont élevées, la GCN5 (*General Control Nonrepressed 5*) acétyle PGC-1 α pour le rendre inactif. Pour que cette réaction soit réalisable l'ACL (ATP Citrate Lyase) doit préalablement avoir fourni l'acétyl-CoA nécessaire à son déroulement (51).

III.1 Molécules agonistes

L'agoniste naturel de l'AMPK est le 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1- β -D-ribofuranoside (AICAR). Cette molécule a déjà été utilisée chez certains sportifs dans le but d'améliorer leurs performances. Nous allons, dans cette partie, nous intéresser aux différentes molécules agissant comme agonistes à différents endroits de la machinerie biochimique décrite précédemment (*Figure 27, molécules vertes*) (50).

III.1.1 AICAR

Le 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1- β -D-ribofuranoside (AICAR) est un intermédiaire de la voie de synthèse de novo des purines. Il a été utilisé comme agent pharmacologique pour la première fois dans les années 1980 pour préserver le flux sanguin cardiaque lors d'opérations chirurgicales. Ce n'est qu'en 2008 à l'aube des jeux olympiques de Pékin qu'une étude menée par le professeur Ronald Evans, et publiée dans la revue *Cell*, révèle les effets stupéfiants d'un traitement de 4 semaines par l'AICAR chez des souris. Evans a observé sur ces rongeurs, y compris chez les sédentaires, une augmentation de l'endurance à la course de 44% sans aucune prise de masse ainsi que l'induction de plusieurs gènes impliqués dans le métabolisme (52).

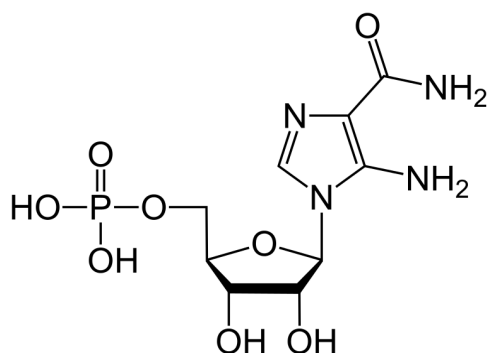


Figure 29 : Molécule d'AICAR

L'AICAR est un agoniste de la protéine kinase activée par l'AMP (AMPK), une sérine-thréonine kinase régulatrice majeure du métabolisme cellulaire. L'AMPK contribue à l'homéostasie du glucose, à l'appétit et à la physiologie de l'exercice (52). Elle est constituée de sous-unités catalytiques $\alpha 1$ et $\alpha 2$, et de sous-unités régulatrices β et γ . L'augmentation du rapport AMP/ATP détermine l'activation de l'AMPK en réponse aux épisodes de stress énergétique comme l'absence de glucose, l'exercice physique, l'ischémie ou l'hypoxie. L'AMPK est activée de façon allostérique par l'AMP et inhibée par l'ATP par compétition pour un même site de fixation sur la sous-unité régulatrice γ . La liaison de l'AMP favorise la phosphorylation des sous-unités catalytiques α par les AMPK kinases comme LKB1. L'AMPK ainsi activé va phosphoryler et donc activer PGC-1 α . En augmentant le rapport NAD⁺/NADH, l'AMPK favorise l'action de SIRT1, une enzyme phosphorylant aussi PGC-1 α (53). La

prise d'AICAR aboutit ainsi à la stimulation de récepteurs impliqués dans la respiration cellulaire, tels que PPAR δ .

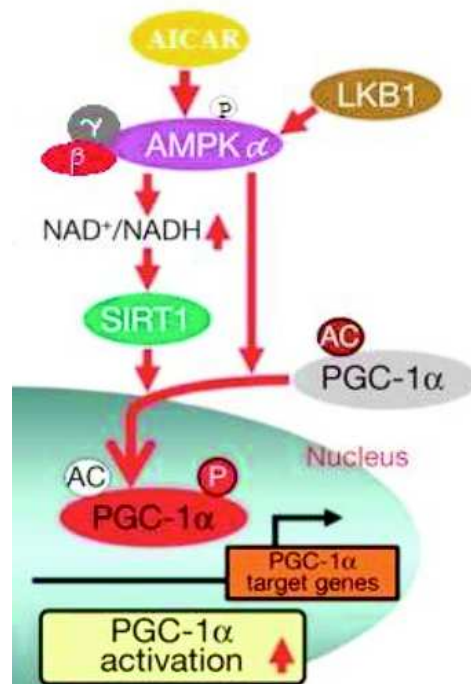


Figure 30 : Mécanisme d'action de l'AICAR (53)

L'étude d'Evans montre que l'AICAR peut augmenter l'endurance chez une souris sédentaire en reprogrammant génétiquement son métabolisme musculaire. Cette molécule est en effet capable, en activant l'AMPK, de transformer les fibres musculaires adultes en fibres de type I. L'AMPK est au cœur de cette adaptation génétique pour plusieurs raisons. Elle est capable de détecter les concentrations basses d'ATP et d'augmenter le métabolisme oxydatif. L'exercice induit l'activation et l'importation nucléaire de l'AMPK, où elle peut potentiellement interagir avec des facteurs de transcription. Enfin, une baisse de son activation chez des souris transgéniques provoquant une diminution de l'exercice volontaire, l'AMPK peut être considérée comme un signal vecteur de l'attractivité à l'exercice (52).

En démontrant que l'AMPK est constitutivement active dans les muscles transgéniques VP16-PPAR δ et que l'AICAR n'induit pas l'expression de gènes oxydants dans les cellules dépourvues de PPAR δ , l'étude d'Evans met le doigt sur un partenariat moléculaire entre l'AMPK et PPAR δ . Trente des trente-deux gènes oxydants activés par l'AICAR sont activés chez les souris VP16-PPAR δ . Il existe donc une

synergie d'action entre l'AICAR et les agonistes PPAR δ tels que le GW1516 (aussi appelé GW501516). La comparaison de l'expression des gènes induits par un traitement simultané par GW1516 et AICAR d'une part et d'un traitement par GW1516 seul, couplé à un entraînement en endurance d'autre part, confirme ce phénomène. 40% des gènes induits par le GW1516 en période d'entraînement sont retrouvés lors de l'administration des deux molécules chez les souris sédentaires (52).

III.1.2 Ligands REV-ERB

III.1.2.1 Mécanisme d'action

Les récepteurs REV-ERB sont des récepteurs nucléaires principalement connus pour leur rôle dans le contrôle du rythme circadien. Les REV-ERB ou « reverse strand of Erb » sont codés sur le brin opposé du gène du récepteur de l'hormone alpha-thyroïdienne. Des études récentes ont montré le rôle du récepteur REV-ERB α dans la régulation de la concentration musculaire en mitochondries (54). Ce récepteur influence le métabolisme du muscle squelettique et sa capacité oxydative en modifiant la dynamique de la biogénèse et de l'autophagie mitochondriale. Il a été prouvé que l'ablation génétique de REV-ERB α réduit l'activation de l'axe AMPK-SIRT-PGC-1 α et ainsi la génération de nouvelles mitochondries en augmentant parallèlement le renouvellement des mitochondries existantes. A l'inverse, l'activation pharmacologique de REV-ERB α dans le muscle squelettique augmente le nombre et la fonctionnalité des mitochondries, améliorant ainsi la capacité globale d'exercice (54).

III.1.2.2 Molécules

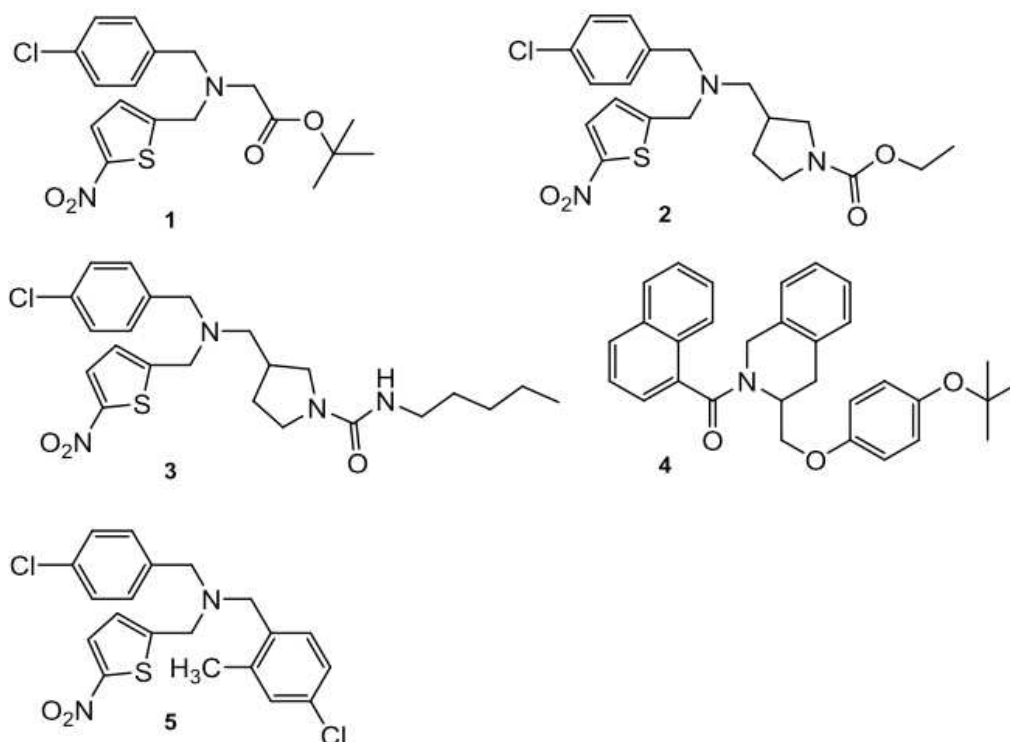


Figure 31 : Structures de GSK4112 (1), SR9009 (2), SR9011 (3), SR10067 (4) et GSK2945 (5)

Le premier ligand synthétique étudié en détail était GSK4112 (également appelé SR6452). Cette molécule présente une disponibilité orale limitée. Les analogues de deuxième génération sont SR9009, SR9011, SR10067 et GSK2945.

III.1.3 Composés activant les sirtuines (STACS)

III.1.3.1 Généralités sur les sirtuines

Les sirtuines jouent un rôle central dans la survie cellulaire, l'inflammation, le métabolisme énergétique et le vieillissement. Ces enzymes sont considérées comme des cibles pharmaceutiques prometteuses pour le traitement de maladies liées à l'âge, notamment le cancer, le diabète de type 2, les troubles inflammatoires et la maladie d'Alzheimer (55).

Le terme « sirtuines » est dérivé du mot « sir-two-ins » en référence à la protéine homologue chez les levures, Sir2 (régulateur silencieux de l'information) (56). Les sirtuines sont présentes chez tous les êtres vivants. Grace à leur activité désacétylase NAD-dépendante, elles sont classées dans la catégorie III des histones désacétylases. Cette catégorie comprend les enzymes utilisant le nicotinamide adénine dinucléotide (NAD^+) comme cofacteur. Cette réaction est caractérisée par le transfert du groupement acétyl depuis la lysine N-terminale de l'histone vers un ADP-ribose. Elle engendre le clivage du NAD^+ en nicotinamide et en 2'- et 3'-O-acétyl-ADP-ribose. Le nicotinamide exerce alors un rétrocontrôle négatif sur cette réaction. (Figure 29) (57).

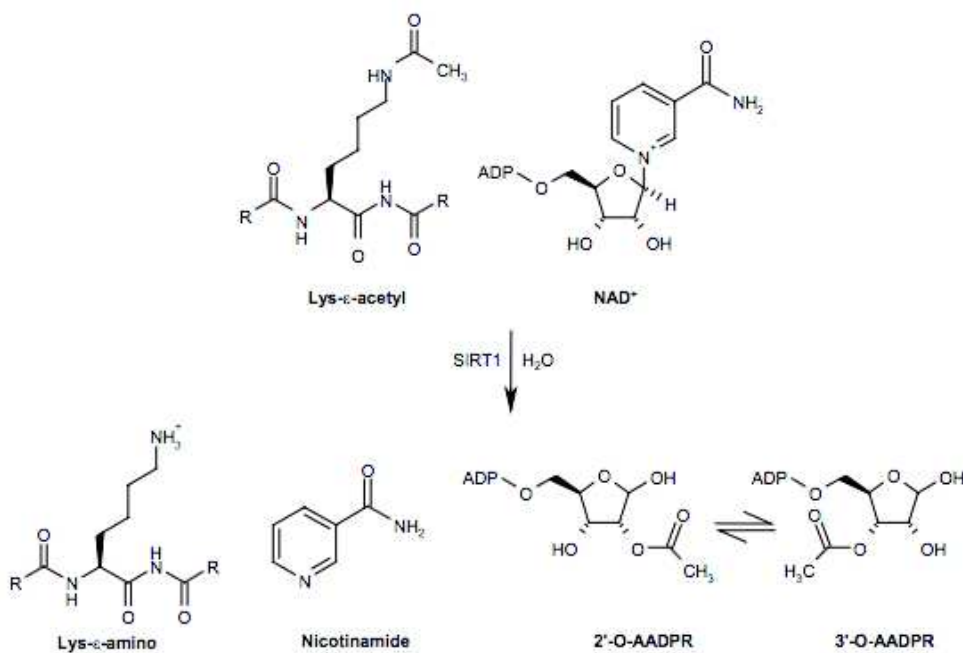


Figure 32 : Réaction de désacétylation d'une protéine par la sirtuine 1 en présence de NAD^+ (58)

Les sirtuines sont aussi dotées d'une activité ADP-ribosyltransférase qui leur permet de modifier l'action de certaines molécules en leur greffant un groupement ADP-ribosyl (Figure 30) (57).

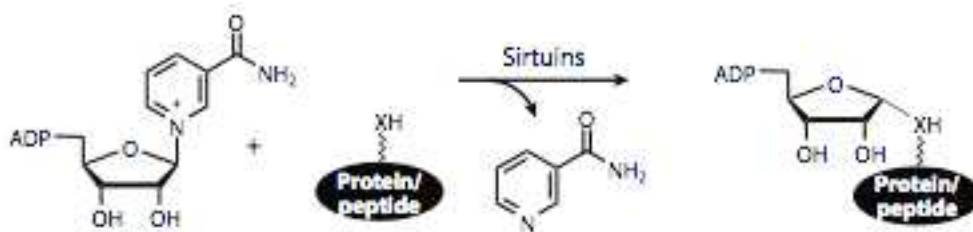


Figure 33 : Réaction d'ADP-ribosylation d'une protéine par les sirtuines (57)

Il existe 7 homologues de sirtuines (SIRT 1-7) chez l'homme. Les différentes sirtuines ont une localisation, une activité ainsi que des interactions qui leur sont propres (Figure 34, Tableau 1) (59) :

- **SIRT1** : Cette protéine est exprimée différemment dans le noyau et/ou dans le cytoplasme selon le tissu et les conditions physiologiques et pathologiques. Il existe une navette, la protéine CRM1, capable de transporter SIRT1 dans l'un ou l'autre de ces compartiments. Cette sirtuine est uniquement dotée d'une activité désacétylase. La désacétylation de plusieurs facteurs de transcription tels que p53, FoxO, NFκB, p73 et Ku70 va permettre à la cellule de lutter contre l'apoptose. Les protéine p53 et p73 sont promotrices de l'apoptose en réponse au stress oxydatif et aux radiations. FoxO régule la différenciation, la transformation cellulaire le métabolisme et déclenche l'apoptose en réponse au stress. NFκB sensibilise la cellule à l'action apoptotique du TNFα. A l'inverse de ces quatre facteurs, la désacétylation de Ku70, facteur de survie de l'ADN induit par la restriction calorique, va permettre son activation et non son inhibition. SIRT1 active aussi les récepteurs nucléaires aux androgènes, aux estrogènes et les PPARγ ainsi que leur co-activateur PGC-1α.
- **SIRT2** : Cette protéine est cytoplasmique, on la retrouve au niveau du cerveau, du cœur, des testicules et des muscles squelettiques. Elle diminue la dynamique des microtubules et donc la mobilité cellulaire en exerçant une activité désacétylase sur l'α-tubuline. Elle contrôle le cycle cellulaire en agissant sur le facteur de transcription homéobox A10 (HOXA10) et l'histone 4 et inhibe aussi le facteur de transcription FoxO.
- **SIRT3** : On retrouve cette protéine mitochondriale au niveau du cœur, du cerveau, des testicules, du foie, des reins, des muscles et du tissus adipeux. Elle favorise la respiration mitochondriale en activant l'AMPc, l'acétyl-Coa

synthétase (AceCS) et les protéines désacétylées non couplées UCP1 et PGC-1 α .

- SIRT4 : Cette protéine est aussi mitochondriale. On la retrouve dans tous les tissus mais surtout dans le cœur, le cerveau, les reins, le foie et le pancréas. SIRT4 régule la sécrétion d'insuline en exerçant une activité ADP-ribosyltransférase sur les translocases des nucléotides adényliques (ADP et ATP) ANT2 et ANT3 au niveau des cellules bêta des îlots de Langerhans. Elle provoque une diminution de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose.
- SIRT 5 : Cette protéine mitochondriale est dotée d'une faible activité mitochondriale, son rôle biologique est encore méconnu.
- SIRT 6 : Cette sirtuine est nucléaire, grâce à son action ADN-ribosyltransférase, elle interagit avec l'ADN polymérase β pour réparer l'ADN par excision de base. Elle joue un rôle dans le vieillissement humain.
- SIRT 7 : On retrouve cette sirtuine dans le nucléole. Elle est présente dans les tissus hautement prolifératifs : la rate, les ovaires, la thyroïde, le foie et les testicules. Elle est absente ou faiblement présente dans les tissus non prolifératifs tels que les cœur le cerveau et les muscles. Elle interagit avec l'ADN polymérase 1 et les histones pour réguler la croissance cellulaire, le métabolisme et jouer ainsi un rôle dans la survie cellulaire.

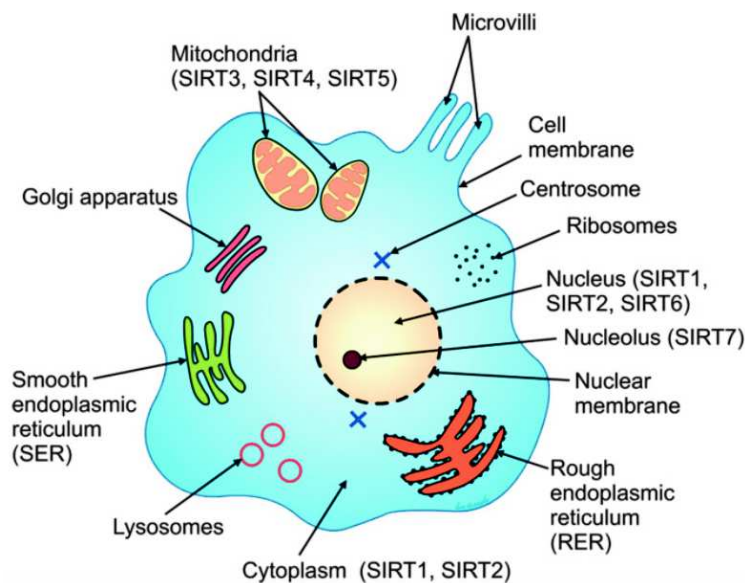


Figure 34 : Localisation des différentes sirtuines (59)

Sirtuine	Localisation intracellulaire	Activité	Interactions	Implications biologiques
SIRT1	Noyau / Cytosol	Désacétylase	FOXO, PGC-1 α , AR, ER, p53, Ku70, NF κ B, HES1	Survie biologique / Réparation ADN / Homéostasie des lipides et du glucose / Résistance au stress / Sécrétion insuline / Dégradation axonale
SIRT2	Cytosol	Désacétylase	Tubuline, H4, HOXA10	Contrôle du cycle cellulaire / Motilité cellulaire
SIRT3	Mitochondrie	Désacétylase	AceCS2, UCP-1, PGC-1 α	Thermogénèse / Métabolisme
SIRT4	Mitochondrie	ADP-ribosyl-transférase	GDH	Sécrétion de l'insuline / Métabolisme
SIRT5	Mitochondrie	Désacétylase	Inconnue	Inconnue
SIRT6	Noyau	ADP-ribosyl-transférase	ADN Pol β	Réparation de l'ADN / Homéostasie du glucose
SIRT7	Nucléole	Inconnue	Pol I	ADNr transcription

Tableau 1 : Localisation, activité, interactions et implications biologiques des différentes SIRT (59)

Certaines études ont démontré que les sirtuines étaient capables de réguler le métabolisme et le vieillissement en réponse à des variations de régimes alimentaires, notamment lors d'un régime de restriction calorique chez des animaux (60)(61)(62). Chez les mammifères, il existe de nombreux exemples dans lesquels les sirtuines sont nécessaires pour des adaptations physiologiques à des interventions diététiques, notamment le jeûne, la restriction calorique et un régime riche en graisse. Il a été démontré que SIRT1 et SIRT3 étaient induits par la restriction calorique dans de nombreux tissus et que leur ablation génétique se montrait très néfaste lors d'un régime de restriction calorique. Chez les souris, la surexpression de SIRT1 se montre protectrice dans de nombreuses maladies et la surexpression de SIRT6 prolonge la durée de vie de ces rongeurs. L'expansion mitochondriale et du métabolisme oxydatif lors de la restriction calorique ainsi que la réduction des effets des espèces réactives de l'oxygène et de l'inflammation au cours d'un régime riche en graisse sont les fonctions majeurs responsables de ces effets (55).

III.1.3.2 Régulation du métabolisme mitochondrial par les sirtuines

Parmi les sirtuines que nous venons de détailler précédemment, quatre entretiennent un rôle étroit avec les mitochondries. SIRT1 augmente la masse mitochondriale dans les muscles et le foie et les SIRT3, 4 et 5, directement présentes dans la matrice mitochondriale, régulent l'action de protéines impliquées dans le métabolisme.

SIRT1

La désacétylation du coactivateur PGC-1 α par SIRT1 va permettre l'activation de ce dernier ainsi que sa liaison au récepteur PPAR δ . Ce phénomène provoque l'augmentation du nombre de mitochondries, la transcription de gènes responsables de la conversion des fibres glycolytiques de type II en fibres oxydatives de type I et donc une augmentation importante de l'endurance à l'effort (55).

Les sirtuines mitochondriales (SIRT3, SIRT4 et SIRT5)

Une nouvelle approche expérimentale combinant une purification par immuno-affinité de peptides portant des résidus de lysine acétylés après digestion protéolytique d'extraits de mitochondries et une analyse spectroscopique de masse a conduit à démontrer qu'au moins 20% des protéines mitochondriales étaient acétylées. Les protéines de toutes les principales voies métaboliques (cycle de Krebs, phosphorylation oxydative, β -oxydation des acides gras et cycle de l'urée), ainsi que des protéines du canal mitochondrial et des protéines impliquées dans le métabolisme des acides aminés, des glucides et des nucléotides étaient représentées (63). La présence de sirtuines désacétylases dans la matrice mitochondriale régule l'action de ces protéines acétylées (64). Des études récentes ayant montré une augmentation significative du rapport NAD⁺/NADH au cours de périodes de stress métabolique ou pendant un jeûne prolongé, l'utilisation du NAD⁺ comme cofacteur par les sirtuines confère à ces dernières un rôle prépondérant dans la réponse au stress (64).

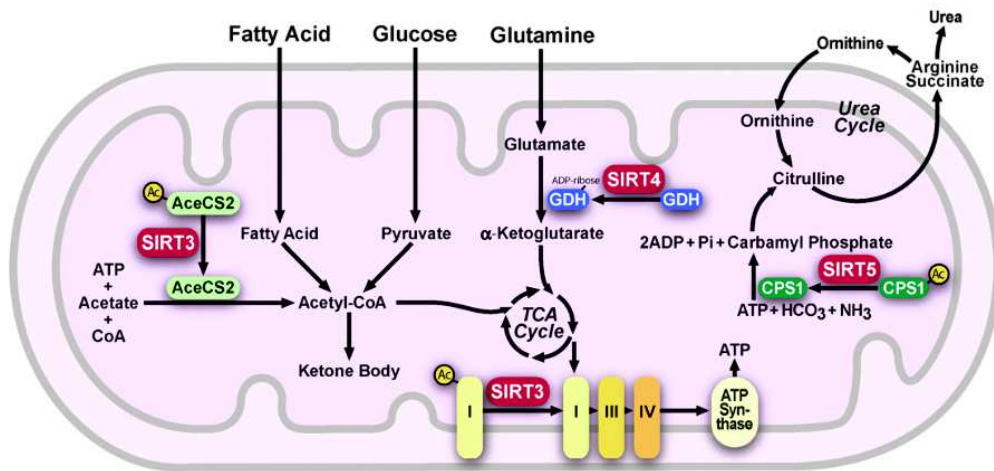


Figure 35 : Régulation des enzymes mitochondriales par les sirtuines SIRT3, 4 et 5 (64)

- SIRT3

Le premier substrat identifié de SIRT3 est l'Acétylcoenzyme A synthase 2 (AceCS2). Cette enzyme de la matrice mitochondriale convertit l'acétate en acétyl-Coa en présence d'ATP et contribue ainsi à augmenter la concentration mitochondriale en acétyl-Coa. Son action est régulée par l'acétylation/désacétylation réversible de la lysine 642. La désacétylation de AceCS2 par SIRT3 active son activité enzymatique. AceCS2 est présente dans le cœur et les muscle et est absente du foie. Son expression est stimulée par la famine et la cétogenèse. SIRT3 régule également directement la synthèse de l'ATP en désacétylant plusieurs protéines du complexe I de transport d'électrons de la mitochondrie telle que NDUFA9 (64).

- SIRT4

SIRT 4 est une protéine de la matrice mitochondriale exprimée dans le foie, le cœur, les reins et le cerveau. Contrairement à SIRT3, elle est dépourvue d'activité désacétylase dépendante de NAD^+ . Elle est dotée d'une action ADP-ribosyl-transférase qui lui permet de réguler négativement la glutamate déshydrogénase (GDH). La GDH est une enzyme de la matrice mitochondriale qui convertit le glutamate en α -cétoglutarate et en ammoniac dans le foie, les reins, le cerveau et les cellules β pancréatiques. Son action génère de l'ATP et augmente ainsi la sécrétion d'insuline

dans les cellules β . L'inhibition enzymatique de la GDH par SIRT4 régule donc négativement la sécrétion d'insuline induite par le glucose et les acides aminés (64).

- SIRT5

SIRT 5 est une protéine de la matrice mitochondriale principalement exprimée dans le cœur, le cerveau, le foie et les reins. Elle possède une activité désacétylase faible. Son principal substrat est la carbamoyl-phosphate synthétase 1 (CPS1), une enzyme de la matrice mitochondriale. La CPS1 transforme l'ammoniac généré par le catabolisme des acides aminés en carbamoyl phosphate, qui sera ensuite transformé en urée afin d'être éliminé. La désacétylation de CPS1 par SIRT5 en présence de NAD^+ augmente son activité et permettra de stimuler la formation d'urée dans des conditions de privation de nutriments lorsque le catabolisme et acides aminées et donc la génération d'ammoniac sont augmentés (64).

III.1.3.3 Molécules activant les sirtuines

Au cours de ce paragraphe, nous allons faire l'historique des composés activant les sirtuines (STACS) mis en évidence par plusieurs études successives. Pour comparer ces différentes STACS nous utiliserons la concentration efficace 50 (EC_{50}) et/ou le pourcentage maximal d'activation de SIRT1. Le premier paramètre correspond à la concentration de médicament produisant 50% de l'effet maximal observé et le second correspond au pourcentage maximal d'activation de SIRT1 atteint à la concentration la plus élevée testée.

Activateurs polyphénoliques

Les premiers activateurs de la sirtuine ont été rapportés en 2003 par Sinclair (65). Cette étude a mesuré le taux de désacétylation engendré par plusieurs molécules polyphénoliques dérivées de plante possédant des propriétés activatrices de SIRT1. L'activateur le plus puissant était le resvératrol (3,5,4'-trihydroxy-*trans*-stilbène) isolé de la peau de raisin. Cette molécule a montré des effets bénéfiques dans plusieurs modèles in vivo différents. Le traitement au resvératrol a prolongé la durée de vie de cellules de

levures, de vers ronds, de mouches et de poissons vertébrés. Chez la souris, le resvératrol a démontré sa capacité à améliorer de nombreux paramètres associés au syndrome métabolique tels que la résistance à la prise de poids avec un régime riche en graisse, une sensibilité accrue à l'insuline, une fonction mitochondriale améliorée et une fonction motrice améliorée avec une capacité aérobie accrue du muscle squelettique. Le resvératrol a une EC_{50} de 46 μ M et une activation maximale de 200%. Le picéatannol, l'isoquiritigénine, la butéine, la fisétine et la quercétine sont des activateurs polyphénoliques moins puissants que le resvératrol, produisant une activation maximale inférieure à 100% (66).

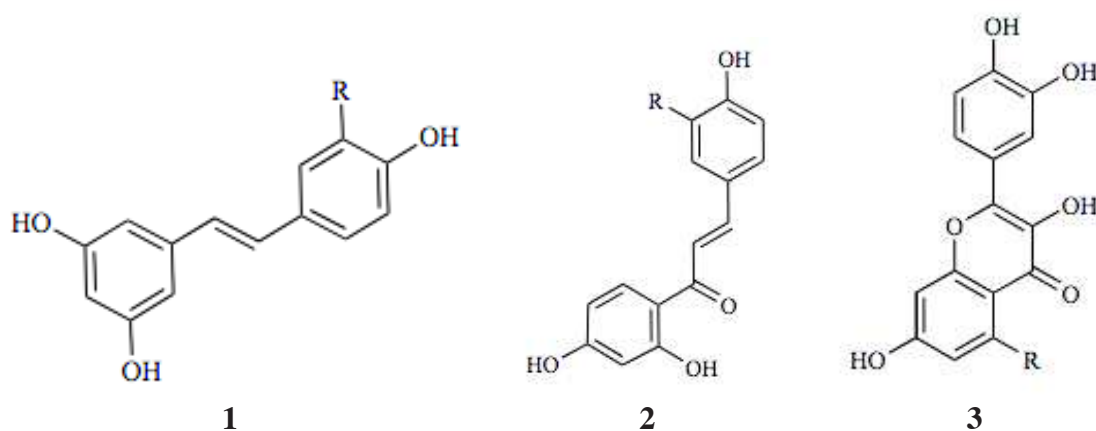


Figure 36 : Structures des activateurs polyphénoliques des sirtuines : (1) Resvératrol ($R = H$) et Picéatannol ($R = OH$) ; (2) Isoquiritigénine ($R = H$) et Butéine ($R = OH$) ; (3) Fisétine ($R = H$) et Quercétine ($R = OH$) (66)

Activateurs pyrroloquinoxalines

En 2006, Nayagam et ses collaborateurs ont effectué un criblage à haut débit avec une série de pyrroloquinoxalines, activateurs *in vitro* de SIRT. Ils ont ainsi identifié 3 molécules activant SIRT1 à plus de 200% à la concentration de 10 μ M (67).

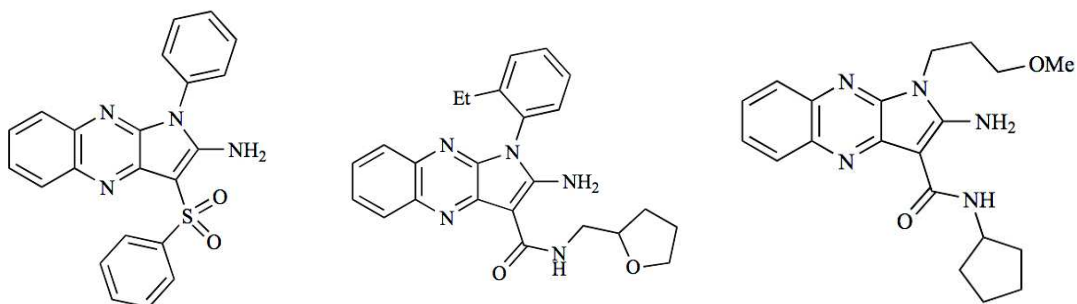


Figure 37: Structures des activateurs pyrroloquinoxalines des sirtuines (66)

Activateurs oxazolopyridines

Au cours des années suivantes Bemis et ses collaborateurs ont démontré qu'une série d'oxazolopyridines et d'hétérocycles associés montraient une forte activation *in vitro* de SIRT1 (68). Certaines de ces molécules se sont révélées être des activateurs beaucoup plus puissants que le resvératrol, avec des EC_{50} descendant jusqu'à $0,7 \mu\text{M}$ et une activation maximale de SIRT1 d'environ 240% pour la plus efficace d'entre elles (66).

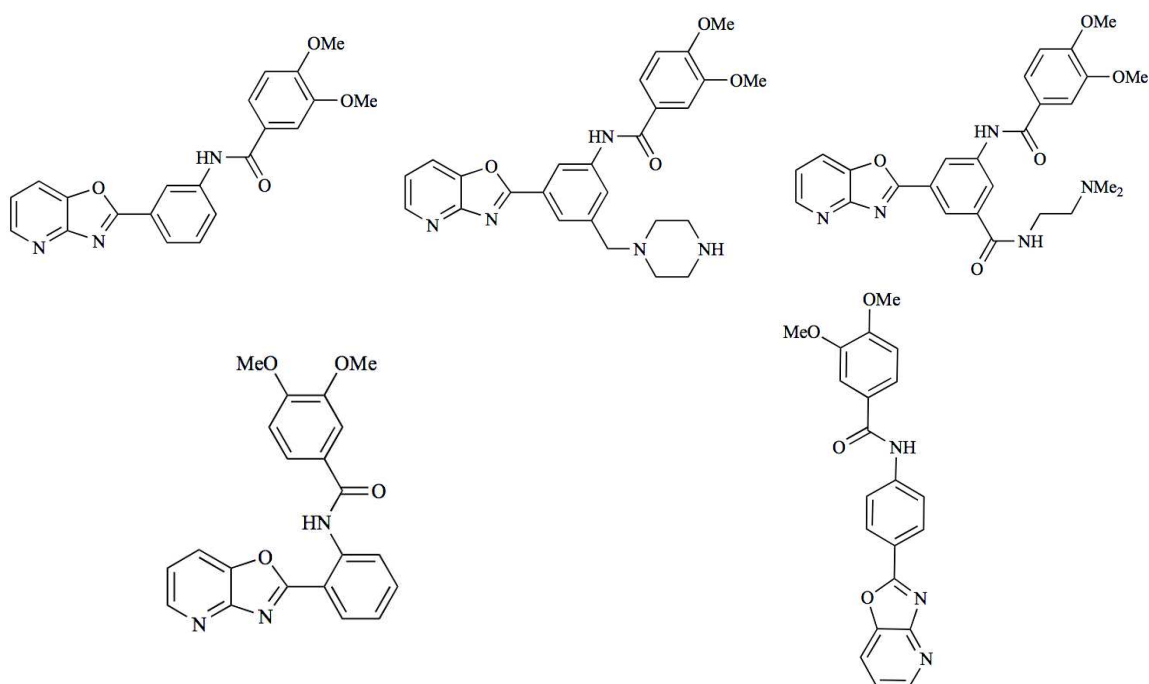


Figure 38 : Structures des activateurs oxazolopyridines des sirtuines (66)

Les azabenzimidazoles et les benzimidazoles

Les azabenzimidazoles et les benzimidazoles, deux familles de molécules étroitement apparentées se sont révélés être des activateurs très puissants de SIRT1. Les premiers ont une EC_{50} de $0,5 \mu\text{M}$ et une activation maximale de SIRT1 de 270% et les seconds présentent une EC_{50} de $0,4 \mu\text{M}$ et une activation maximale allant jusqu'à 595% (66). La STAC-5 fait partie de la famille des azabenzimidazoles. C'est une molécule très active qui a une EC_{50} de $0,4 \mu\text{M}$ et une activation maximale de 1310%.

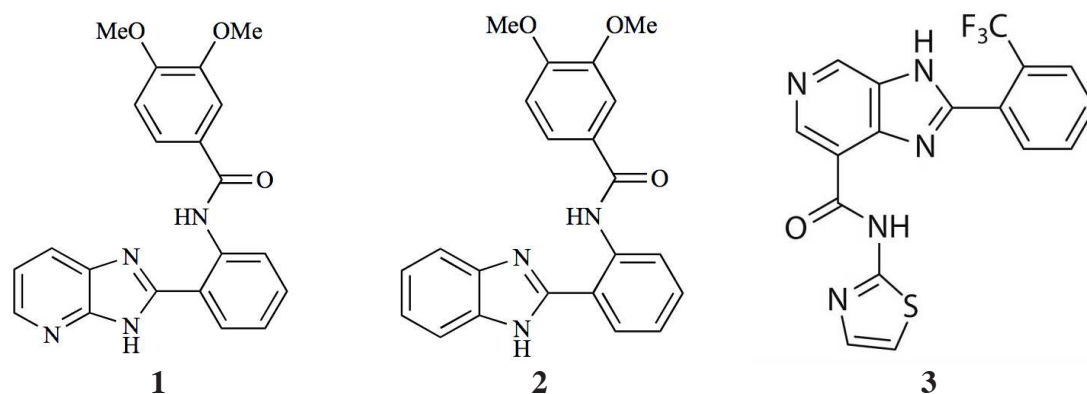


Figure 39 : Structures des azabenzimidazoles (**1**), des benzimidazoles (**2**) et de STAC-5 (**3**) (66)(69)

Activateurs imidazothiazoliques

En 2007, une série d'imidazothiazoles, des petites molécules non polyphénoliques, ont été testées in vivo par Milne et ses collaborateurs dans le cadre d'un programme sur le diabète de type 2 (70). Le composé SRT1720 a réduit la glycémie postprandiale chez des souris obèses induites par l'alimentation. Il a de plus diminué la concentration d'insuline, amélioré la sensibilité à l'insuline et augmenté la capacité mitochondriale chez ces souris. Ce dernier présente une EC_{50} record de 0,16 μ M et une activation maximale de 781% (66).

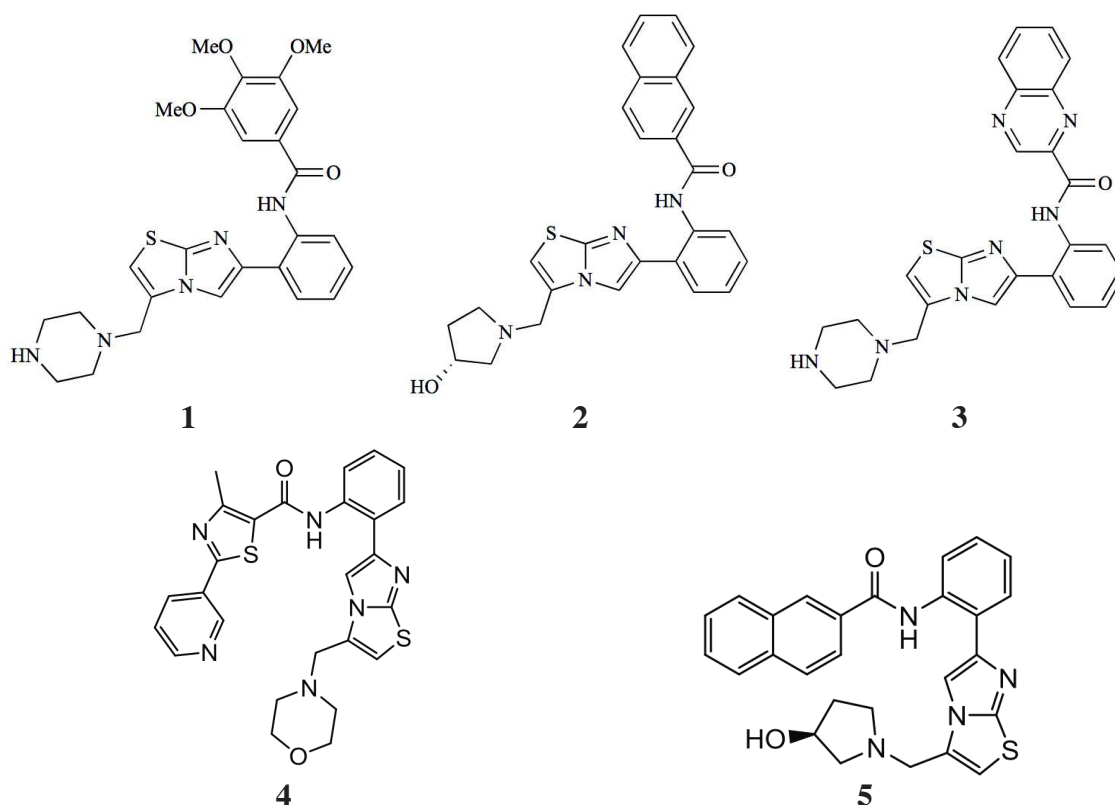


Figure 40 : Structures des activateurs imidazothiazoliques des sirtuines : SRT1460 (STAC-1) (1), SRT2183 (2), SRT1720 (STAC-4) (3), SRT2104 (4), SRT2183 (5) (66)

Autres activateurs

Parmi les molécules activatrices des sirtuines on retrouve aussi des thiazolopyridines et des échafaudages à base d'urée. C'est de cette dernière famille, découverte en 2013, que fait partie STAC-8, une des STACS les plus actives, présentant une EC_{50} de 1,2 μ M et une activation maximale de 890%.

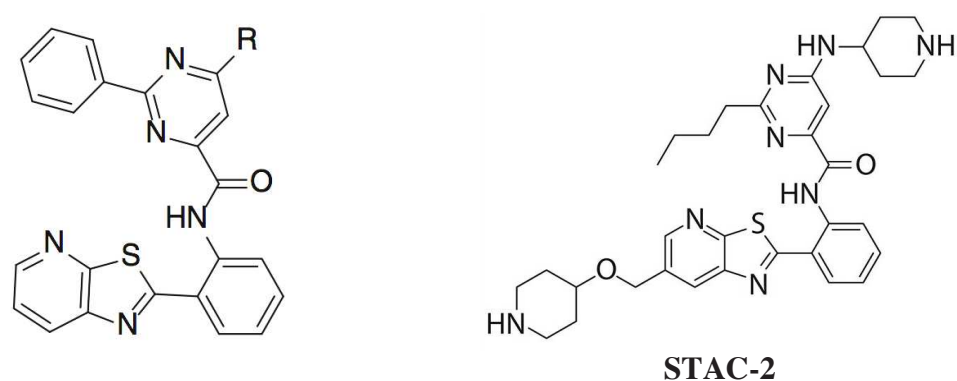


Figure 41: Structures des activateurs thiazolopyridines des sirtuines (69)

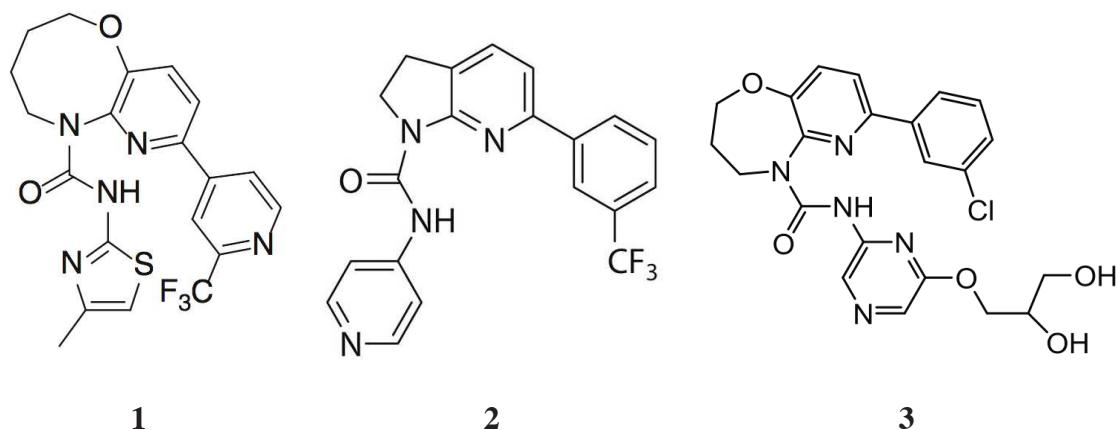


Figure 42 : Structures des échafaudages à base d'urée activateurs des sirtuines : STAC-8 (1), STAC-9 (2), STAC-10 (3) (71)

Comme nous venons de le voir, l'ensemble de ces recherches ont abouti à l'élaboration d'agonistes diversifiés de SIRT1 beaucoup plus puissants que le resvératrol. Le fait que ces molécules n'activent pas les autres sirtuines est encore aujourd'hui un mystère (55). Les sirtuines SIRT3-5 ayant un rôle important dans la régulation du métabolisme mitochondrial, la découverte d'une molécule capable d'activer ces trois sirtuines en plus de SIRT1 pourrait être une réelle avancée dans le mimétisme pharmacologique des effets de la restriction calorique.

III.1.4 Précurseurs du NAD⁺

Le nicotinamide adénine dinucléotide (NAD) est une coenzyme présente dans toutes les cellules vivantes. Il s'agit d'un dinucléotide, composé de deux bases nucléiques, l'adénine et le nicotinamide. NAD⁺ est la forme oxydée du NAD et NADH sa forme réduite. Le NAD intervient dans le métabolisme comme transporteur d'électrons dans les réactions d'oxydoréduction. Il intervient aussi dans l'ADP-ribosylation post-traductionnelle des protéines nouvellement synthétisées.

III.1.4.1 Synthèse du NAD⁺

Le NAD peut être synthétisé in vivo par deux voies métaboliques distinctes. La première de ces voies est la voie de synthèse de novo des kynurénines à partir du tryptophane. Le tryptophane est converti en acide quinolinique, lui-même converti en

acide nicotinique mononucléotide (NaMN) par transfert sur un phosphoribose. L'ensemble est transféré par les enzymes Nma1 et Nma2 sur une unité adénylate pour former l'acide nicotinique adénine dinucléotide (NaAD⁺), qui sera ensuite aminé pour former le NAD. La seconde voie, appelée voie de sauvetage, utilise trois précurseurs vitaminiques que sont l'acide nicotinique, le nicotinamide et le *N*-ribosylnicotinamide. Ces trois molécules sont aussi appelées vitamine B₃ ou niacine ou encore vitamine PP pour *pellagra preventive* car une carence en cette vitamine est responsable de la pellagre. Ils peuvent être obtenus dans l'alimentation grâce au transporteur membranaire Tna, ou par consommation du NAD⁺ cellulaire par certaines enzymes telles que les sirtuines. Cette voie de sauvetage fait appel à l'enzyme Npt1 pour synthétiser le NaMN à partir de l'acide nicotinique (72).

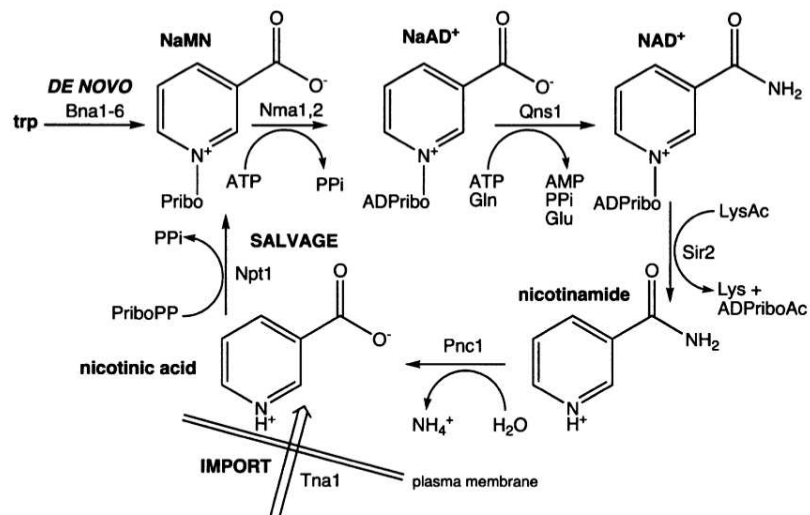


Figure 43 : Différentes voies de synthèse du NAD⁺ chez *S. cerevisiae* (72)

III.1.4.2 Fonctions biochimiques du NAD⁺

Le NAD a un rôle essentiel dans le métabolisme cellulaire. Il intervient comme coenzyme dans les réactions d'oxydoréduction, comme donneur de groupe ADP-ribose dans les réactions d'ADP-ribosylation et comme substrat des sirtuines.

Interaction avec les oxydoréductases

Le rôle principal du NAD est de transporter des électrons. Grâce aux enzymes oxydoréductases il est capable de transférer des électrons d'une molécule à une autre.

Les oxydoréductases transfèrent un anion hydrure H^- du substrat vers le cycle du nicotinamide (*Figure 44*) (73).

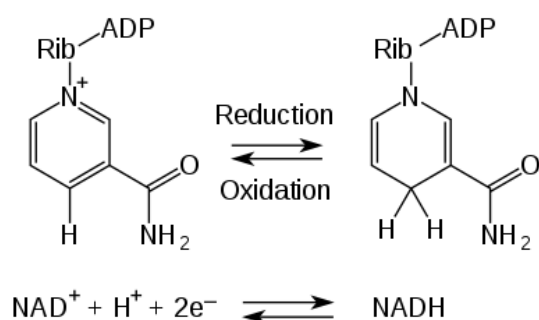


Figure 44 : Réaction de transfert d'un anion hydrure d'un substrat vers une molécule de NAD^+ (73)

Fonctions dans la respiration cellulaire

L'énergie libérée par la réduction du NAD^+ en $NADH$ est utilisée par la cellule pour oxyder les nutriments. Le NAD^+ intervient dans la dégradation des acides gras et du glucose en participant à la β -oxydation ainsi qu'à la glycolyse et au cycle de Krebs. Le $NADH$ libéré lors de ces réactions est oxydé par la chaîne respiratoire de manière à créer un gradient électrochimique à travers la membrane interne mitochondriale. Ce gradient permettra à la pompe à proton de produire de l'ATP. Le $NADH$ est le substrat majeur de la phosphorylation oxydative (73).

Le NAD^+ étant nécessaire à l'activité désacétylase de SIRT1 et SIRT3, il joue un rôle majeur dans l'augmentation du nombre de mitochondries et dans la conversion des fibres glycolytiques de type II en fibres oxydatives de type I provoquées par ces enzymes (50)(74).

III.1.4.3 Molécules

Au vu des actions bénéfiques du NAD^+ , l'administration de précurseurs de cette molécule a fait l'objet de nombreuses recherches. L'acide nicotinique est reconnu depuis longtemps pour ses effets bénéfiques sur les profils lipidiques et même pour son amélioration à court terme du diabète de type 2. Malheureusement, le traitement par l'acide nicotinique entraîne souvent des bouffées vasomotrices sévères. Il a récemment

été démontré que l'administration de nicotinamide riboside (NR), un précurseur naturel du NAD^+ , augmente le taux de NAD^+ et donc le métabolisme oxydatif cellulaire. Une fois entré dans la cellule, le NR est métabolisé en nicotinamide mononucléotide (NMN) par la nicotinamide riboside kinase (NRK) (72). Le NR étant présent dans le lait, il constitue une source alimentaire pour la production de NAD^+ . Une étude publiée en 2012 met en évidence les bénéfices d'un traitement par NR (74). Celui-ci augmente significativement la teneur intracellulaire et mitochondriale en NAD^+ dans les cellules et tissus de mammifères, il améliore l'activité de SIRT1 et SIRT3, la dépense énergétique et les performances oxydatives du muscle squelettique et du tissu adipeux brun.

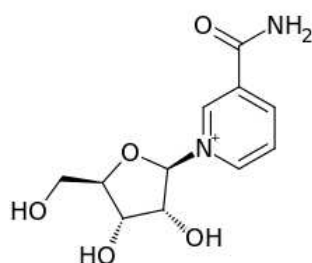


Figure 45 : Molécule de nicotinamide riboside (NR) (75)

III.1.5 Agonistes AdipoR1

III.1.5.1 Mécanisme d'action

Le récepteur AdipoR1 est un des récepteurs à l'adiponectine, une adipokine antidiabétique sécrétée par les adipocytes. AdipoR1 est un récepteur transmembranaire couplé aux protéines G. La stimulation de ce récepteur induit un influx extracellulaire de calcium, et donc une activation accrue de la protéine-kinase-kinase dépendante du calcium et de la calmoduline β (CaMKK β), provoquant à son tour l'activation de l'AMPK puis de SIRT1. Il en découle une augmentation de l'expression de PGC-1 α ainsi qu'une augmentation de son activation par phosphorylation. L'activation d'AdipoR1 stimule donc la biogénèse mitochondriale et facilite ainsi le métabolisme oxydatif et la synthèse de fibres musculaires de type I (76). Grâce à cette action d'organe endocrinien, le tissu adipeux participe à la régulation de l'homéostasie énergétique. La concentration d'adiponectine circulante est inversement corrélée à

l'indice de masse corporelle (IMC). L'adiponectine est une hormone protectrice ayant des effets bénéfiques sur la résistance à l'insuline, les maladies cardiovasculaires, les états inflammatoires et le cancer.

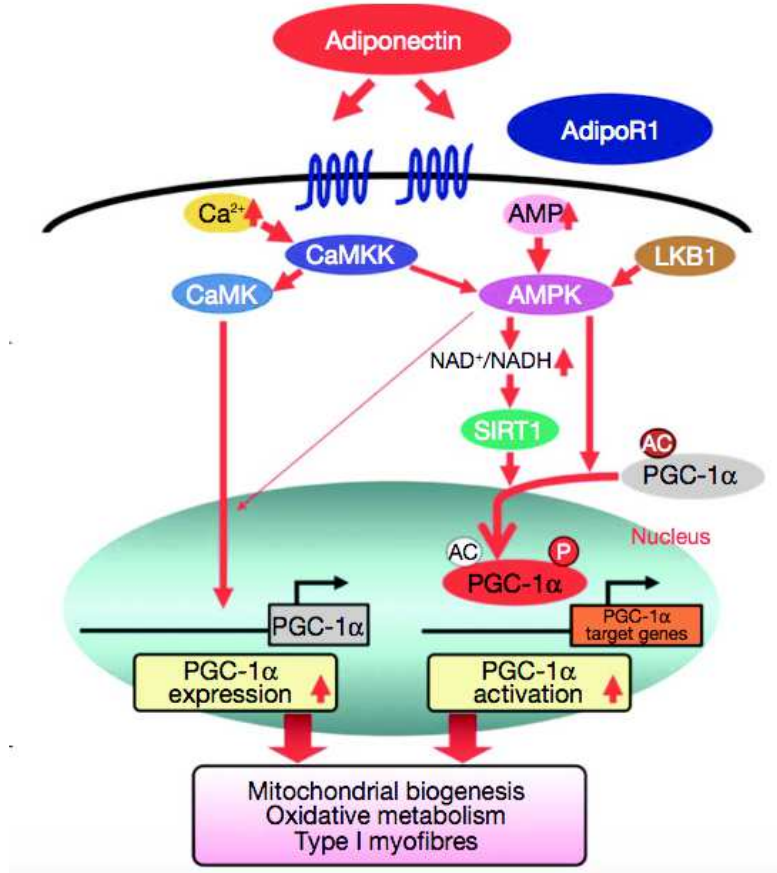


Figure 46 : Mécanisme d'action du récepteur AdipoR1 (76)

III.1.5.2 Molécules

L'adiponectine est une cytokine relativement grande de 244 acides aminés. Les chercheurs ont donc cherché à synthétiser des petits peptides capables de produire des effets biologiques similaires ou supérieurs à ceux de l'adiponectine. L'utilisation du criblage au haut débit a aussi permis de mettre en évidence plusieurs agonistes des récepteurs à l'adiponectine (77)(78).

Agonistes peptidiques

Une étude menée en 2011 par Otvos et ses collaborateurs a permis de démontrer que le peptide ADP355 présentait une activité similaire à l'adiponectine à l'égard de cellules cancéreuses de gliomes et de cancers du sein. ADP355 induit les voies de signalisation typiques de l'adiponectine dans les cellules cancéreuses (79). Ce peptide, très stable dans le sérum humain, a été décliné par les équipes de Otvos en 2014 pour donner naissance aux composés dimérisés ADP398 (cyclique) et ADP399 (linéaire) ainsi qu'à un composé trimérisé, l'ADP500. L'ADP400 est quant à lui un antagoniste des récepteurs à l'adiponectine (77).

Number/Name	Sequence ^a	Function
355 ADP355	H-DAsn-Ile-Pro-Nva-Leu-Tyr-DSer-Phe-Ala-DSer-NH ₂ DY675-ADP355	First generation agonist (published)
398 ADP355 + C1 Cyclic dimer	Cyclo (DAsn-Ile-Pro-Nva-Leu-Tyr-DSer-Phe-Ala-DSer-His-Pro-DAsn-Ile-Pro-Nva-Leu-Tyr-DSer-Phe-Ala-DSer-His-Asp)-OH	Control cyclic peptide to verify structure calculations (new)
399 ADP355 + C1 Linear dimer	(H-DAsn-Ile-Pro-Nva-Leu-Tyr-DSer-Phe-Ala-DSer-His-Pro) ₂ -Dab-NH ₂ (branched) DY675-ADP355 + C1	Second generation agonist (new)
400 Chex-DSer-8	H-Chex-Gly-Leu-Tyr-DSer-Phe-Ala-DSer-NH ₂	First generation antagonist (new)
500 Branched trimer	(H-DSer-Asn-Ile-Pro-Nva-Leu-Tyr-DSer-Phe-Ala-Tyr-His-Pro) ₂ -Dab-Dab(H-DSer-Asn-Ile-Pro-Nva-Leu-Tyr-DSer-Phe-Ala-Tyr-His-Pro)-NH ₂	Control trimeric agonist (new)

Tableau 2 : *Peptides modifiant la réponse des récepteurs à l'adiponectine (77)*

Agonistes non-peptidiques

En 2013, l'équipe de Yiyi Sun a effectué un criblage à haut débit d'une bibliothèque de 10 000 composés naturels, basé sur la polarisation de fluorescence, afin d'identifier des ligands des récepteurs à l'adiponectine. L'Arctiine, la (-)-Arctigenine, la Gramine et le Matairesinol sont les 4 agonistes les plus actifs sur AdipoR1 mis en

évidence par cette étude (78). La même année, une étude menée par Miki Okada-Iwabu a démontré que l'agoniste AdipoRon et le composé 112254 augmentaient significativement la phosphorylation de l'AMPK via AdipoR1 de manière dose-dépendante (80).

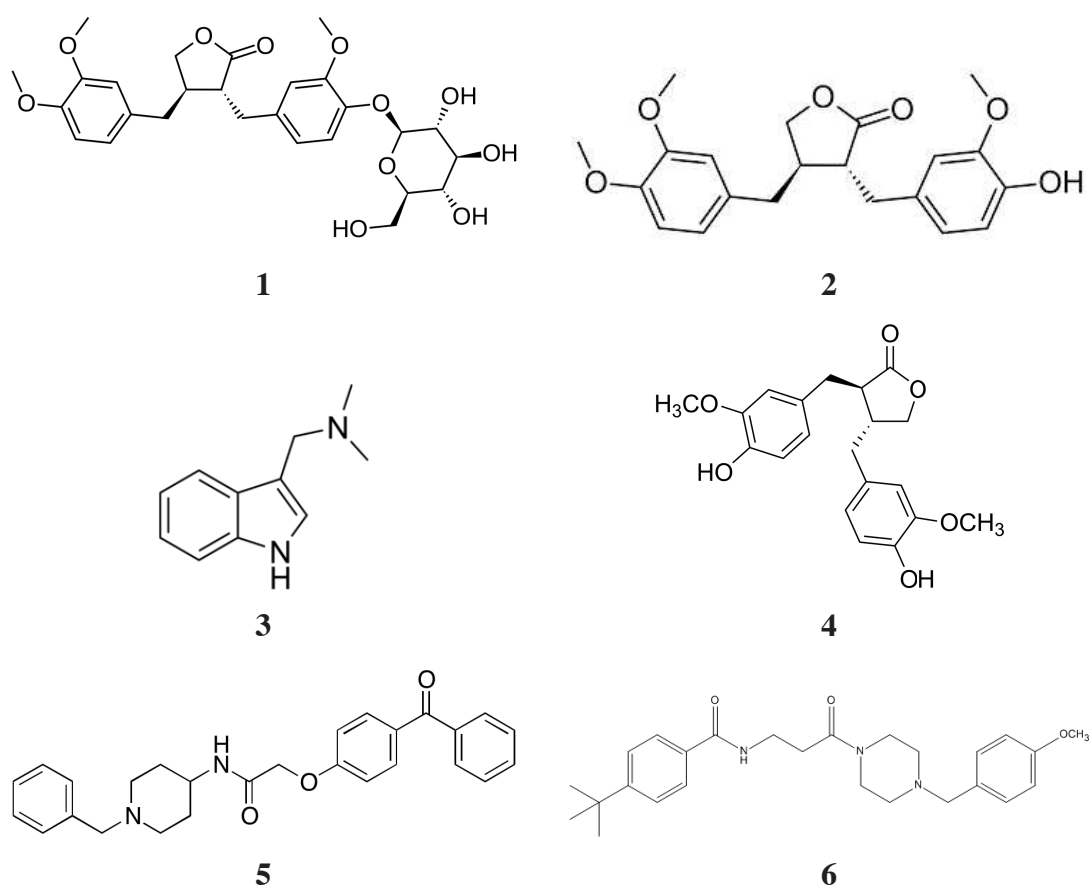


Figure 47 : Structures de l'Arctiine (1), de la (-)-Arctigenine (2), de la Gramine (3) du Matairesinol (4), de l'AdipoRon (5) et du composé 112254 (6)

III.1.6 Agonistes PPAR δ

Comme nous l'avons vu dans le chapitre II, la quasi-totalité des conséquences biochimiques de la stimulation de PPAR δ tendent à favoriser l'utilisation musculaire de l'oxygène sanguin et des acides gras ainsi qu'à protéger l'intégrité du réseau vasculaire. Nous allons, dans cette partie, rentrer plus en détail dans les mécanismes cellulaires secondaires à l'activation de ce récepteur.

III.1.6.1 Mécanismes d'actions

Les ligands PPAR δ , qu'ils soient naturels ou synthétiques, traversent la membrane cellulaire et sont automatiquement pris en charge par les protéines cytoplasmiques FABP (*Fatty Acid-Binding Proteins*) pour être transportés dans le noyau. Une fois dans le noyau ils vont se fixer dans une poche du LBD (*Ligand Binding Domain*), acquérir une conformation active, relarguer le complexe protéique inhibiteur (co-répresseur) et recruter un co-activateur tel que PGC-1 α . Le PPAR δ va alors former un hétérodimère avec le récepteur X des rétinoïdes (RXR), préalablement activé par l'acide 9-cis rétinoïque ou par des agonistes synthétiques du RXR. Le dimère ainsi formé va se lier à la séquence d'ADN PPRE, spécifique aux PPARs, dans le but d'activer la transcription de gènes (49).

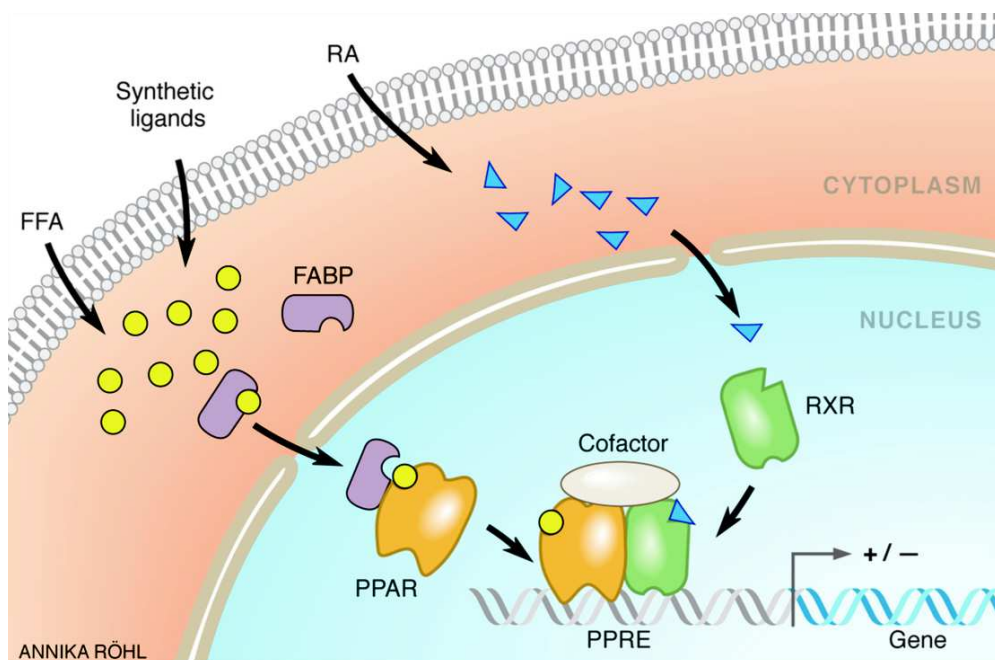


Figure 48 : Mécanisme d'activation du PPAR δ (49)

Régulation du type de fibre musculaire

L'utilisation d'animaux transgéniques a permis de mieux comprendre le rôle de régulation moléculaire joué par PPAR δ et son co-activateur PGC-1 α au sein des fibres musculaires. L'expression ciblée de PGC-1 α chez la souris a entraîné la conversion de

muscles riches en fibres de type II en muscles de phénotypes oxydants, plus lents, riches en fibres de type I (81). En ce qui concerne PPAR δ , les souris transgéniques surexprimant le gène PPAR δ présentent une proportion accrue de fibres de type I. La formation de fibres de type I est aussi augmentée chez les souris dont l'expression du co-répresseur RIP140 est réduite alors que sa surexpression transgénique réduit les fibres de type I. On dénombre moins de fibres lentes de type I chez les souris dont PPAR δ a été sélectivement éliminé du muscle. Ces souris ont également une expression réduite en PGC-1 α , ce qui suggère que PPAR δ peut réguler l'expression de ses cofacteurs les plus importants. Chez l'homme, il existe une expression plus élevée de PPAR δ et de PGC-1 α dans les biopsies de muscles squelettiques effectuées sur des cyclistes élités, population présentant une forte proportion en fibre de type I. Parallèlement l'expression de PPAR δ et de PGC-1 α est réduite dans les muscles de sujets atteints de lésions de la moelle épinière, ayant perdu leurs fibres de type I (49)(82). En 2008, Evans a étudié les effets de l'administration d'un agoniste PPAR δ (le GW1516) chez des souris entraînées. Il s'est aperçu que l'exercice physique, combiné à l'administration d'agonistes PPAR δ , induisait de manière synergique une spécification des fibres musculaires en fibres de type I (52).

Régulation de l'oxydation des lipides et du métabolisme énergétique musculaire

L'activation de PPAR δ stimule l'expression de gènes clés impliqués dans l'entrée des acides gras dans le myocyte et dans l'oxydation qui s'en suit. On dénombre parmi ces gènes des régulateurs du stockage des acides gras tels que la stéroyl-CoA-désaturase (Scd1), la coenzyme A acylacrylique synthase (FAS, Fasn) et la protéine de réponse sérique Ic (SREBP1c, Srebf1c) et des régulateurs de l'absorption des acides gras comme le transporteur d'acide gras (FAT, Cd36) et la lipoprotéine lipase (LPL). La protéine membranaire CD36 facilitant l'entrée des acides gras qui sont aussi des ligands de PPAR δ , elle amplifie les effets de PPAR δ en participant à un rétrocontrôle positif de l'activation du récepteur. L'activation accrue de PPAR δ par le GW1516 stimule donc l'absorption et l'oxydation des lipides dans le muscle squelettique (52)(49).

PPAR δ est aussi capable de déplacer le métabolisme énergétique musculaire vers l'utilisation des acides gras en réduisant l'oxydation des glucides. PPAR δ stimule

l'expression de la pyruvate déshydrogénase kinase 4 (PDK4), enzyme inactivant par phosphorylation le complexe pyruvate déshydrogénase (PDC), ce qui réduit l'oxydation des glucides et déplace la sélection du carburant musculaire vers l'oxydation des graisses (49). Ainsi l'inhibition de la PDC induite par l'exercice est beaucoup plus puissante chez les rats traités avec l'agoniste PPAR δ , GW610742 (aussi appelé GW0742) (83).

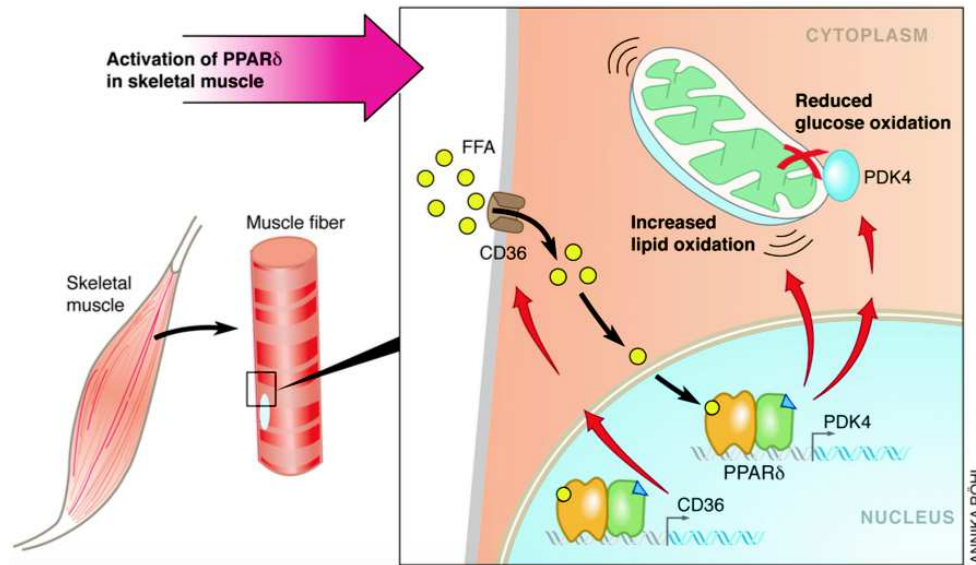


Figure 49 : Les modifications de l'expression des gènes induites par PPAR δ entraîne une oxydation accrue des lipides. Les acides gras libres (FFA) pénètrent dans le muscle squelettique via le transporteur d'acide gras CD36, entraînant ainsi l'activation de gènes dépendant de PPAR δ telles que la protéine PDK4, inhibitrice de l'oxydation du glucose et de gènes promoteurs de l'oxydation des lipides, ou la protéine CD36 elle-même (49)

Régulation des fonctions mitochondriales

Comme nous venons de le voir précédemment, le traitement par des agonistes PPAR δ entraîne une augmentation de l'expression de plusieurs gènes impliqués dans la voie d'oxydation des acides gras en acétyl-CoA au sein de la matrice mitochondriale. Cependant, à ce jour, aucun gène régulant directement la biogénèse mitochondriale n'a été découvert comme cible de PPAR δ . Il a néanmoins été démontré que la surexpression de PPAR δ dans le muscle squelettique de souris entraînait une augmentation de la teneur en PGC-1 α , son propre co-activateur, et ce sans affecter la

teneur en ARNm de PGC-1 α . La protéine PGC-1 α agissant indépendamment de PPAR δ comme régulateur principal de la biogénèse mitochondriale (par exemple en activant les récepteurs liés aux œstrogènes comme nous le verrons plus tard), cela explique la croissance du nombre de mitochondries en l'absence d'augmentation de l'expression des gènes cibles après stimulation de PPAR δ (49). D'après Evans, le gain d'endurance d'une souris entraînée à qui nous injectons de l'AICAR et du GW1516 est de l'ordre de 70%, soit 26% de plus qu'une souris entraînée sous AICAR seul. Cette observation confirme la synergie d'action qu'il existe entre les agonistes PPAR δ et l'AICAR, activateur de l'AMPK (52).

Régulation de l'athérosclérose

PPAR δ exerce des effets protecteurs directs et indirects sur le développement des plaques d'athérome. En modifiant l'expression de gènes clés au niveau des cellules endothéliales, des cellules musculaires lisses et des macrophages, il agit directement sur la paroi vasculaire. Les différentes actions qu'exerce PPAR δ sur le métabolisme cellulaire contribuent à diminuer les facteurs de risques cardio-vasculaire que sont l'obésité, les dyslipidémies, la résistance à l'insuline et la diminution des activités physiques (48).

- Effets vasculaires directs

Régulation de l'apoptose endothéliale : Les cellules endothéliales peuvent entrer en apoptose en réponse à diverses conditions physiopathologiques : l'hypoxie, les cytokines pro-inflammatoires, les endotoxines bactériennes, les facteurs de risque athérogène tels que l'homocystéine et les lipoprotéines. L'apoptose des cellules endothéliales est notamment impliquée dans l'angiogenèse, les thromboses et l'athérosclérose. Il a récemment été démontré que PPAR δ protégeait les cellules endothéliales contre l'apoptose provoquée par H₂O₂ en induisant l'expression de la prostacycline (PGI₂) anti-apoptotique (48)(84).

Régulation de l'activation endothéliale : Lorsqu'il est exposé à des stimuli pro-inflammatoires tels que le facteur de nécrose tumoral (TNF) ou le lipopolysaccharide

bactérien (LPS), l'endothélium vasculaire induit des facteurs pro-inflammatoires et pro-coagulants. La molécule d'adhésion intracellulaire-1 (ICAM-1), la molécule d'adhésion vasculaire-1 (VCAM-1), la E-sélectine et la protéine chimio-attractrice des monocytes MCP-1 font partie de ces molécules d'adhésion pro-inflammatoires. Des études menées avec l'agoniste PPAR δ GW0742 ont montré que ce dernier inhibait l'expression macrophagique de gènes pro-inflammatoires, comme la cyclo-oxygénase 2 (COX2) et l'oxyde nitrique synthase inductible (iNOS), induit par le LPS. GW0742 a aussi réduit les lésions athérosclérotiques et l'expression de MCP-1 et ICAM-1 dans l'aorte de souris dépourvues de récepteurs aux LDL (LDLR $^{-/-}$). L'administration de concentrations élevées de l'agoniste PPAR δ L-165041 a, de son côté, inhibé les expressions de VCAM-1 et MCP-1 induites par le TNF- α . En culture primaire de cellules endothéliales de veines ombilicales humaines (HUVEC), les agonistes spécifiques PPAR δ GW0742 et GW501516 ont inhibé l'expression de molécules d'adhésion, et donc l'adhérence des monocytes aux cellules endothéliales, induites par TNF- α et l'interleukine-1 β . Dans les cellules endothéliales, les agonistes PPAR δ ont induit l'expression génique d'enzymes antioxydantes comme la superoxyde dismutase-1, la catalase et la thiorédoxine, et ont diminué la production d'espèces réactives de l'oxygène. Il a été prouvé que la liaison d'un ligand synthétique au récepteur PPAR δ provoque la dissociation du répresseur de transcription BCL-6 et l'association de ce dernier avec la région promotrice de VCAM-1. Le corépresseur ainsi libéré se déplace pour réprimer la transcription de gènes pro-inflammatoires tels que VCAM-1 et E-sélectine et contribue ainsi à la protection vasculaire (48).

Régulation de l'angiogenèse : L'angiogenèse fait référence à la formation de nouveaux capillaires à partir de vaisseaux sanguins existants. Elle peut être physiologique lors de la cicatrisation de plaies et d'exercices aérobie ou pathologique lors de maladies cardiovasculaires, de complications de diabète, de maladies inflammatoires et de cancers. Une étude a démontré que le GW501516 stimulait de manière dose-dépendante la prolifération des cellules HUVEC en augmentant l'expression de l'ARNm du facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF) et son récepteur Flt-1 (85). Par la suite, Gaudel *et al.* ont découvert qu'un traitement par GW0742 ou une surexpression musculaire spécifique de PPAR δ favorisait l'angiogenèse dans les muscles squelettiques de souris (86). Les vaisseaux nouvellement formés proviennent notamment de cellules

pro-génitrices de cellules endothéliales (CPE), ce processus est appelé vasculogénèse. Une étude récente a montré que les effets pro-angiogéniques des CPE humaines proviennent en partie de la biosynthèse et de la libération de PGI₂. L'induction de PGI₂ par PPAR δ explique donc l'effet pro-angiogénique de ce dernier. Muhller-Brußelbach *et al.* ont étudié le rôle de PPAR δ dans la croissance de tumeurs. Ils se sont aperçu que, chez les souris PPAR δ ^{-/-}, la croissance était altérée, le flux sanguin était réduit et les structures vasculaires étaient hyperplasiées (48)(87).

Régulation de la prolifération et de la migration des cellules musculaires lisses : Une étude s'est intéressée à l'effet du L-165041 sur les cellules musculaires lisses et s'est aperçue qu'il inhibait la prolifération et la migration de ces dernières. Chez le rat, l'administration de L-165041 a diminué la formation de néointima dans les artères carotides blessées par ballonnet. Les chercheurs se sont rendu compte que l'agoniste PPAR δ réprimait l'expression de la cycline D1 et de la kinase dépendante de la cycline 4 (CDK4) induites par le facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF) (88)(48).

Régulation de l'inflammation causée par les macrophages : Les agonistes PPAR δ ont un puissant effet anti-inflammatoire dans les macrophages. GW0742 a inhibé l'expression de la COX-2 et de l'iNOS induite par le LPS et dans macrophages péritonéaux de souris. Barish *et al.* ont démontré récemment que GW501516 supprimait l'induction génique de MCP-1, MCP-2 et MCP-3 par IL-1, l'interféron- γ (IFN- γ) et l'ester de phorbol dans les macrophages de souris (48)(89).

- Effets vasculaires indirects

Diminution de l'obésité : Comme nous l'avons vu précédemment, la stimulation de PPAR δ engendre l'augmentation de l'oxydation des acides gras, exerçant ainsi un effet protecteur vis-à-vis de l'obésité.

Diminution des dyslipidémies : Des études récentes ont démontré que l'activation de PPAR δ pouvait modifier le profil lipidique chez les animaux et chez l'homme. Olivier Jr. *et al.* se sont aperçus que GW501516 augmentait la concentration en HDL et diminuait la concentration en LDL et en triglycérides chez les primates obèses (90).

L'effet bénéfique de GW0742 et de L-165041 sur la concentration en HDL a également été observé chez des souris obèses et non obèses (91)(92). PPAR δ inhibe l'expression de la protéine Niemann-Pick C1-like 1 (NPCAL1), responsable de l'absorption intestinale du cholestérol, ainsi que de l'ATP-binding cassette A1 (ABCA1), impliquée dans le transport du cholestérol par les macrophages ainsi que de la transformation du cholestérol alimentaire en HDL cholestérol (48)(91).

Régulation de la résistance à l'insuline : L'étude d'Olivier Jr. *et al.* a aussi montré que GW501516 diminuait le niveau d'insuline à jeun chez les primates obèses (90). Les souris clonées d'un gène responsable de leur obésité (souris ob/ob) traitées au GW501516 ont également présenté une tolérance au glucose nettement améliorée et des concentrations postprandiales de glucose plasmatique et d'insuline plus faibles (85). Lee *et al.* ont démontré que GW501516 inhibait la production de glucose hépatique et la libération d'acides gras libres par les adipocytes et augmentait l'élimination du glucose (48)(93).

III.1.6.2 Molécules

La connaissance des ligands physiologiques de PPAR δ que sont les acides gras saturés de 14 à 18 carbones et les acides gras polyinsaturés de 16 à 20 carbones, présentant tous une affinité pour le récepteur de l'ordre du micromolaire, a permis la synthèse de nombreux ligands synthétiques. Les agonistes les plus actifs sont les dérivés de l'acide phénoxyacétique, tels que GW501516 (ou GW1516), GW0742, L165041 et le composé F. Ces quatre molécules sont hautement sélectives pour PPAR δ , elles ont une affinité de l'ordre du nanomolaire et une sélectivité 1000 fois supérieure à celle de PPAR α et PPAR γ . GW501516 et GW0742 ont été optimisés par GSK à partir d'une banque de carboxylates hydrophobes et L165041 a été dérivé d'une approche *in silico* par Merck. L165041 active aussi la protéine sérique-1 associée au facteur de croissance et de différenciation (GASP-1), qui lui-même forme un complexe avec la myostatine et l'inhibe (50). D'autres agonistes, notamment KD3010, développé par le laboratoire Kalypsys et MBX-8025, développé par le laboratoire Metabolex, sont en cours de développement clinique. La Carbaprostacycline et l'Iliprost, deux analogues de la prostacycline, ont quant à eux une affinité pour PPAR δ de l'ordre du micromolaire (48).

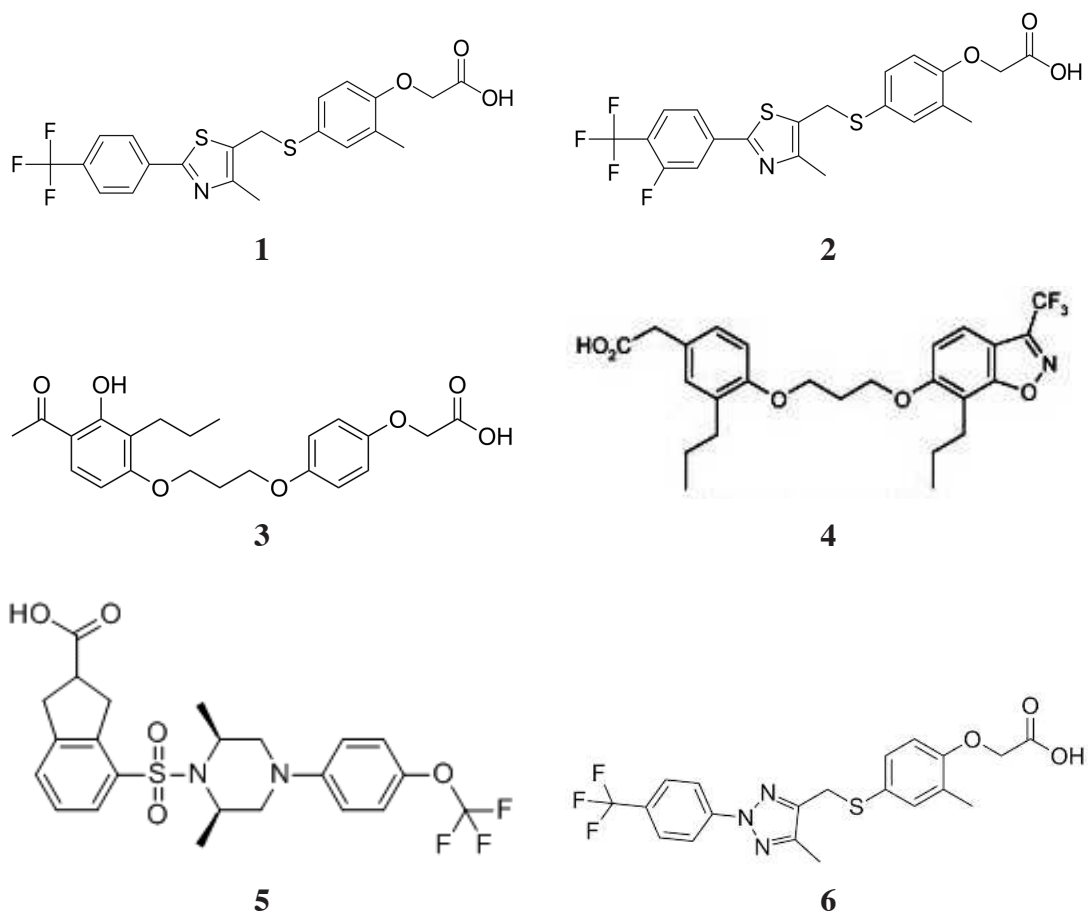


Figure 50 : Structures de GW501516 (1), GW0742 (2), L165041 (3), du composé F (4), de KD3010 (5) et de MBX-8025 (6)

III.1.7 Agonistes ERR

III.1.7.1 Mécanisme d'action

Les récepteurs liés aux œstrogènes (ERRs) appartiennent à la classe des récepteurs nucléaires orphelins et présentent une homologie avec la famille des récepteurs aux œstrogènes (ER). La séquence de ces récepteurs est très étroitement liée aux récepteurs classiques des oestrogènes ER α et ER β , mais elle ne se lie ni à l'œstradiol ni à d'autres œstrogènes stéroïdiens apparentés (94). Ils sont exprimés dans les tissus à forte activité métabolique. ERR α est le plus répandu. ERR β et ERR γ ont quant à eux, une expression plus restreinte. Au même titre que pour les récepteurs PPARs, l'addition du co-activateur PGC-1 α augmente considérablement le niveau

d'activité des récepteurs ERRs. $ERR\alpha$ est un important médiateur de la biogénèse mitochondriale adaptative dans des situations de stress physiologique accru. A l'heure actuelle, aucun ligand endogène des ERRs n'est connu mais des études structurales ont démontré que ce récepteur présentait constitutivement une conformation activée en absence de ligand (95). Des données épidémiologiques récentes ont montré que les populations exposées au perturbateur endocrinien bisphénol A, un antagoniste des récepteurs ERRs, présentaient des prévalences plus accrues en diabète de type 2 et en dysfonctions métaboliques (96). Une étude menée en 2010 a montré que la surexpression musculaire d'un récepteur $ERR\gamma$ constitutivement actif chez des souris transgéniques VP16 $ERR\gamma$ augmentait significativement la capacité à l'effort, l'activité des enzymes mitochondriales et le volume des mitochondries malgré un poids musculaire inférieur chez ces rongeurs. $ERR\gamma$ joue un rôle important dans l'orientation vers un phénotype musculaire à contractions lentes et donc une plus grande capacité d'exercices d'endurance. Cette étude montre notamment que l'activation du récepteur $ERR\gamma$ engendre une augmentation de la transcription du gène *Wisp2*, spécifique du facteur induit par l'hypoxie 2α ($Hif-2\alpha$). Le facteur de transcription $Hif-2\alpha$, physiologiquement activé lorsque la demande en oxygène devient plus importante dans des conditions d'hypoxie, contribue en grande partie à l'action pro-oxydative de $ERR\gamma$ (97).

III.1.7.2 Molécules

Les premiers ligands des récepteurs ERRs à avoir été rapportés sont les ligands des récepteurs aux œstrogènes, le 4-hydroxytamoxifène et le diéthylstilbestrol. Ces molécules sont des agonistes inverses du récepteur $ERR\gamma$. Le laboratoire GSK a par la suite identifié deux acyl hydrazones phénoliques, GSK4716 et GSK9089, toutes deux agonistes des récepteurs $ERR\beta$ et $ERR\gamma$. L'examen des structures cristallines internes des récepteurs $ERR\alpha$, $ERR\gamma$, $ER\alpha$ et $ER\beta$, a révélé que les poches de liaison aux ligands de ces derniers contenaient tous des résidus de glutamate et d'arginine. Ces séquences sont essentielles à la liaison hydrogène avec le cycle phénolique A de l'estradiol. Une étude publiée en 2005 par l'équipe de William J. Zuercher analysant l'activité d'environ 200 acylhydrazones différentes a permis de mettre en évidence les substituant ayant la plus grande efficacité. Les composés ont été criblés en utilisant un

dosage biochimique qui surveillait le recrutement du peptide co-activateur RIP140 NR-box par transfert d'énergie de résonance par fluorescence (FRET) dans le domaine de liaison au ligand purifié de ERR γ . L'introduction d'un groupement amine (-NEt₂) ou isopropyl (-iPr) sur le carbone 4 de l'un des deux noyaux benzéniques (**R1**) de l'acylhydrazone (Figure 51, Tableau 3) a donné naissance aux molécules les plus actives sur ERR γ (94).

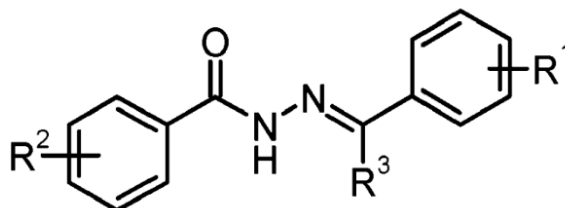


Figure 51 : Structure commune des acylhydrazones étudiées par l'équipe de William J. Zuercher (94)

compd	R ₁	R ₂	R ₃	ERR γ FRET ^a EC ₅₀ (μ M)	ERR γ FRET efficacy (%) ^b
1	–	–	–	0.015	–100
2	–	–	–	0.63	–100
3	4- ⁱ Pr	4-OH	H	1.3	+40
4	4-NEt ₂	4-OH	H	0.13	+55
5	2-OH, 4-NEt ₂	4-OH	H	i.a.	–
6	4-O ^t Bu	4-OH	H	i.a.	–
7	4-NEt ₂	4-H	H	1.6	+55
8	4-NEt ₂	4-NH ₂	H	0.63	+50
9	4-NEt ₂	4-F	H	i.a.	–
10	4-NEt ₂	4-OH	Me	0.50	+40

Tableau 3 : Résultats de l'étude l'équipe de William J. Zuercher avec (a) Recrutement du peptide RIP140 NR-box dans le domaine de liaison au ligand et (b) Variation du recrutement du peptide par rapport aux interactions basales (94)

III.2 Molécules antagonistes et inhibitrices

Au même titre que les molécules agonistes mentionnées ci-dessus, de nouvelles substances inhibitrices ont récemment été identifiées comme capables d'augmenter la disponibilité de PGC-1 α activé (Figure 27, molécules rouges) (50).

III.2.1 Inhibiteurs de la GCN5

III.2.1.1 Mécanismes d'actions

L'histone acétyltransférase (HAT) GCN5 a une action totalement antagoniste à celle des sirtuines. Elle acétyle fortement PGC-1 α , le rendant ainsi inactif. Tout comme SIRT1, GCN5 est un capteur du statut énergétique de la cellule. Son expression est induite par un excès calorique et est réduite lors d'un épisode de restriction calorique. Les groupements acétyl transférés par GCN5 sur les lysines de PGC-1 α proviennent de l'acétyl-CoA. La concentration nucléaire en acétyl-CoA est donc un régulateur majeur de l'activité de GCN5. Une étude récente montre que les quantités nucléaires d'acétyl-CoA sont contrôlées par l'enzyme ATP-citrate lyase (ACL), qui génère de l'acétyl-CoA à partir de citrate dérivé d'acides tricarboxyliques. Les chercheurs se sont aperçus que la neutralisation de ACL avait le même impact sur l'acétylation des histones que la désactivation de GCN5, ce qui prouve l'étroite collaboration d'action entre ces deux enzymes (98). L'inhibition de GCN5 tend donc à stimuler la biogénèse mitochondriale en augmentant l'activation de PGC-1 α (51).

III.2.1.2 Molécules

En 2004, une étude menée par Biel *et al.* a cherché à déterminer des inhibiteurs de GCN5 en utilisant l'échafaudage en α -methylene- γ -butyrolactone, motif récurrent dans de nombreux produits naturels. Biel et al. ont supposé que la poche de liaison à l'histone n'était accessible qu'après la liaison de l'acétyl-CoA à GCN5. Cette poche est composée d'un glutamate en 173 (Glu173) et d'une cystéine en 177 (Cys177), nécessaires à la formation d'un complexe ternaire enzyme-acétyl-CoA-histone. L'intermédiaire tétraédrique ainsi formé (*Figure 52*) est stabilisé par une liaison hydrogène à l'amide du squelette de Cys177 et se décompose en libérant l'histone acétylé et une molécule le coenzyme A. L'échafaudage en α -methylene- γ -butyrolactone a été choisi car il comportait un accepteur potentiel de liaison hydrogène pour l'amide du squelette de Cys177 et un groupe polaire pour une interaction avec Glu173. En plus de cela, la molécule devait posséder une chaîne latérale aliphatique analogue à celle de la lysine.

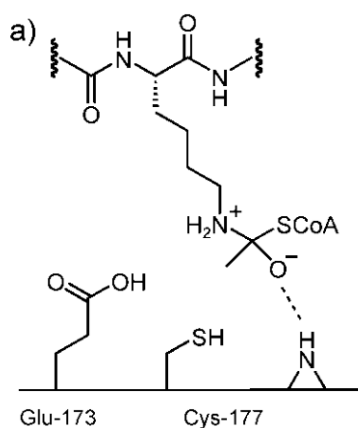


Figure 52 : Intermédiaire tétraédrique dans le mécanisme catalytique de GCN5 (99)

L'une des γ -butyrolactones testées dans un test HAT *in vitro*, en utilisant des protéines recombinantes GCN5 et des protéines histones, a entraîné une inhibition de GCN5 avec une valeur de concentration inhibitrice médiane (CI_{50}) 100 μ M. L'affinité de cet inhibiteur, appelé MB-3 (α -méthylène- γ -butyrolactone 3), pour GCN5 est comparable à celle du substrat naturel, l'histone H3 (99).

En 2009, Chimenti *et al.* ont effectué un criblage phénotypique sur un ensemble de molécules nouvellement synthétisées, dérivées du thiazole dans des souches de *Saccharomyces cerevisiae*. Ils ont sélectionné des composés induisant une inhibition de la croissance dans des souches chez lesquelles le gène codant pour GCN5 a été préalablement supprimé (*gcn5* Δ). C'est ainsi qu'une nouvelle molécule CPTH2, cyclopentylidène-4-[4-(4'-chlorophényl)thiazol-2-yl]hydrazone, a été sélectionnée pour son effet inhibiteur sur la croissance d'une souche de *gcn5* Δ . *In vivo*, elle a diminué l'acétylation de l'histone H3 sur le site spécifique H3-AcK14 (100).

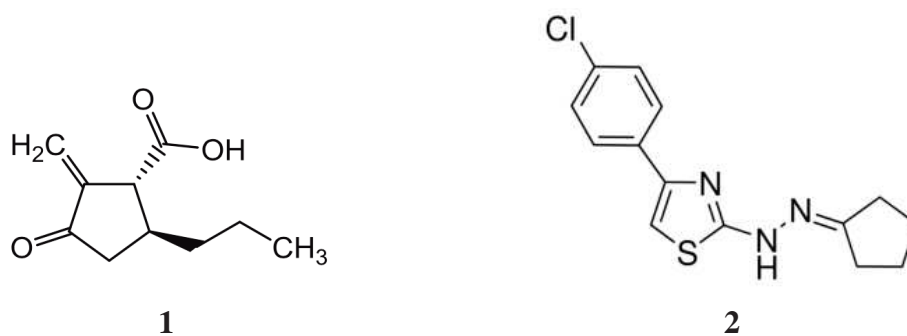


Figure 53 : Structures de MB-3 (1) et CPTH2 (2)

III.2.2 MOTS-c

MOTS-c (cadre de lecture ouvert du peptide de type c de l'ARN ribosomal 12S mitochondrial) est un peptide de signalisation mitochondrial de 16 acides aminés qui régule la sensibilité à l'insuline et l'homéostasie métabolique. L'ARN ribosomal 12S est l'un des deux ARN ribosomiques codés par le génome mitochondrial des eucaryotes (101).

III.2.2.1 Mécanismes d'actions

L'existence de sORF (cadres de lecture ouverts courts) dans l'ADN mitochondrial ou dans l'ARN ribosomique, tels que MOTS-c, permet à la mitochondrie de communiquer avec des organes distants comme les muscles squelettiques et ainsi réguler la physiologie globale. Une étude utilisant des cellules surexprimant MOTS-c (MOTS-c-ST) et des cellules HEK293 traitées de manière exogène par MOTS-c a permis d'étudier plus en détail le mécanisme de ce sORF (101).

Régulation de la voie folate-AICAR-AMPK

MOTS-c modifie l'expression génique d'enzymes du cycle folate-méthionine et de la biosynthèse *de novo* des purines. On observe chez les cellules MOTS-c-ST et HEK293 traitées de manière exogène par MOTS-c, une diminution des taux de 5-méthyl-tétrahydrofolate (5Me-THF), la forme la plus abondante de folates activés, et de méthionine ainsi qu'une augmentation des taux d'homocystéine. L'épuisement du 5Me-THF intracellulaire, aussi observé lors d'un traitement par méthotrexate, engendre une diminution de la synthèse des purines ainsi qu'une augmentation du niveau d'AICAR. La concentration en AICAR est près de 20 fois supérieure dans cellules MOTS-c-ST que dans les cellules témoins. On observe ainsi une phosphorylation accrue de l'AMPK α et de PGC-1 α et donc une stimulation de la respiration cellulaire et une augmentation du métabolisme des acides gras (101).

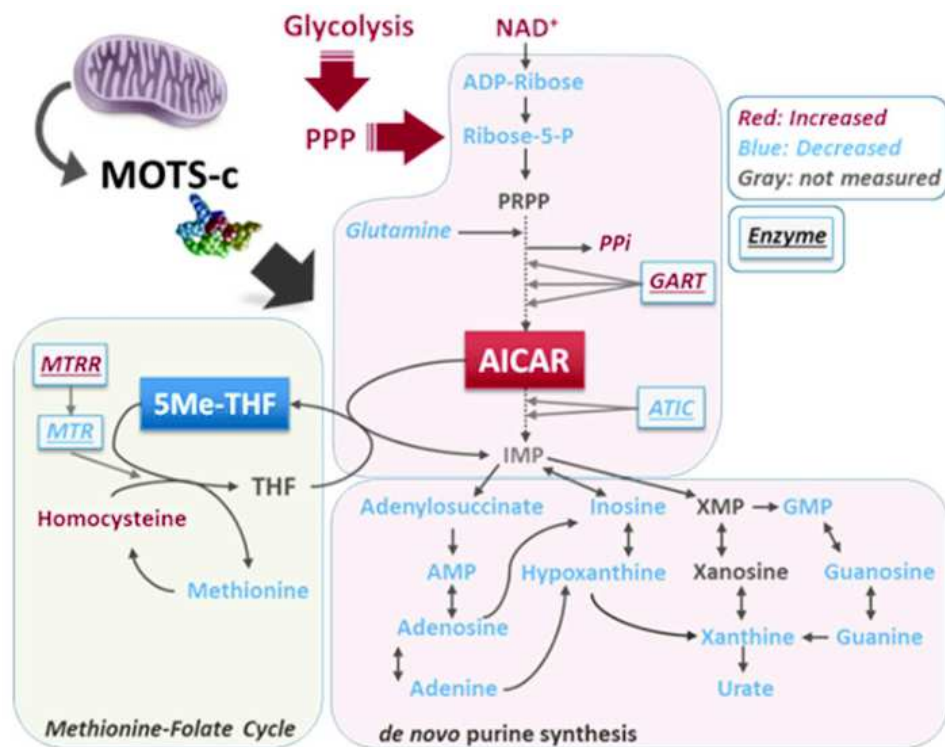


Figure 54 : Effets de MOTS-c sur le cycle folate-méthionine et la biosynthèse de novo des purines (101)

Régulation du métabolisme des lipides

Les cellules MOTS-c-ST présentent des taux plus élevés en navettes acyl-carnitine et en myristoyl-CoA, un intermédiaire de la β -oxydation, ainsi que des taux réduits en acides gras essentiels par rapport aux cellules témoins. La réduction significative des acides gras à longues chaînes a favorisé une utilisation accrue des acides gras (101).

Régulation de la sensibilité à l'insuline

Les souris traitées par MOTS-c pendant 7 jours ont montré une clairance significativement accrue du glucose ainsi qu'une augmentation de 30% du débit de perfusion de glucose exogène lors de l'étude du clamp euglycémique-hyperinsulinémique. Le traitement par MOTS-c a augmenté significativement le taux d'absorption du glucose par les tissus périphériques stimulé par l'insuline (IS-GDR). Ces résultats prouvent que MOTS-c améliore la sensibilité à l'insuline et l'homéostasie

du glucose. L'insuline favorise le stockage du glucose dans les tissus périphériques, comme les muscles squelettiques, et supprime la production de glucose hépatique. L'augmentation de la sensibilité à l'insuline est notamment visible chez des souris consanguines CD-1 recevant un régime alimentaire riche en graisses (HFD 60% en calorie), chez qui MOTS-c stimule l'expression de GLUT4 dans les muscles squelettiques (101).

Prévention de l'obésité

Comme nous venons de le voir, MOTS-c prévient l'obésité induite par un régime alimentaire riche en graisses (HFD) en augmentant la dépense énergétique et en améliorant l'utilisation du glucose et la sensibilité à l'insuline, réduisant ainsi l'accumulation de graisses (101).

III.2.3 Inhibiteurs des voies de signalisation de la myostatine

Au cours de ces dernières années, plusieurs chercheurs se sont intéressés à l'influence de l'entraînement sur les concentrations de myostatine dans l'organisme. Ils ont tous démontré que l'action de la myostatine est naturellement inhibée par un entraînement adapté à la prise de masse musculaire. L'action de la myostatine est donc plus faible chez un sportif que dans la population « normale ». L'entraînement agit soit directement sur les taux de myostatine, soit sur les voies de signalisation de cette dernière (102)(103)(104)(105).

L'inhibition de la production et de l'activité de la myostatine est une nouvelle stratégie pour le traitement des troubles de la fonte musculaire, tels que la dystrophie musculaire, la cachexie et la sarcopénie. Les inhibiteurs de la myostatine agissent au niveau extracellulaire en se liant directement à la myostatine ou à son complexe récepteur ActRIIB / Alk4/5 afin de bloquer l'activation du signal en aval. Plusieurs inhibiteurs de synthèse ont été développés en s'inspirant des mécanismes d'action des inhibiteurs naturels que sont le propéptide de la myostatine, la follistatine, Fstl3 et Gasp1 (106). En plus de la myostatine, ActRIIB est activé par un groupe diversifié de

membres de la famille TGF- β , comprenant l'activine A, BMP-2, BMP-7 et GDF-11 (107).

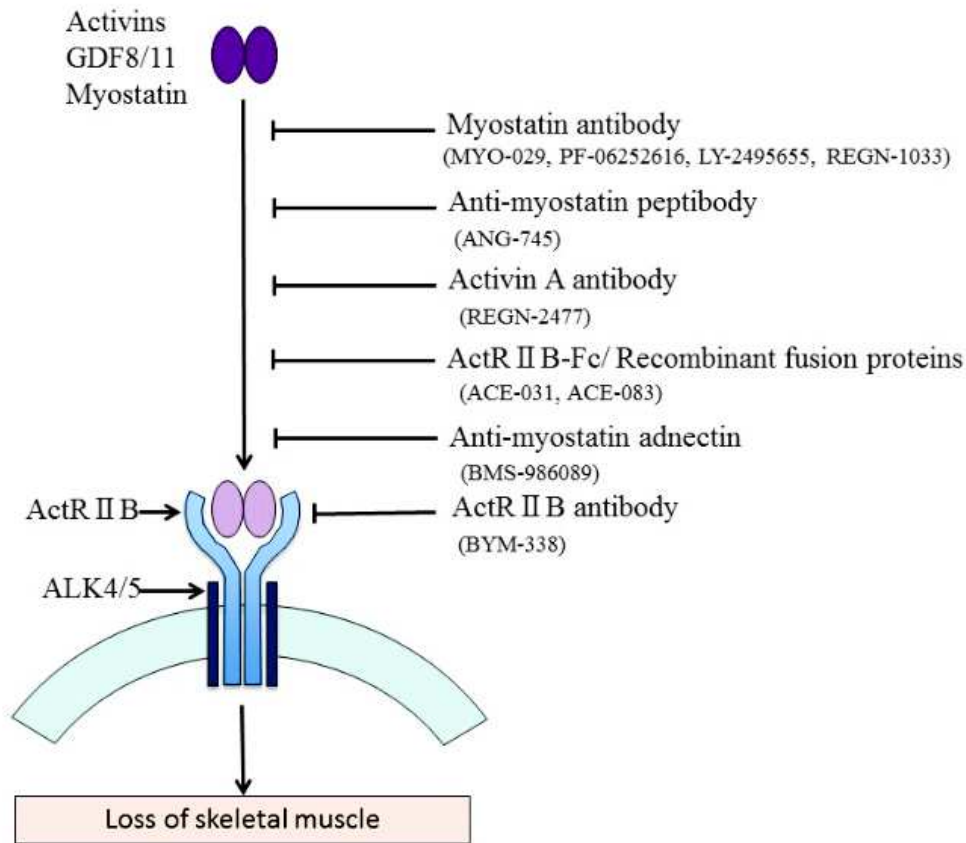


Figure 55 : Résumé des cibles thérapeutiques des inhibiteurs de la voie de signalisation de la myostatine (107)

III.2.1.1 Anticorps anti-myostatine

Ces molécules se lient à la myostatine et neutralisent son activité en empêchant sa liaison au récepteur endogène de haute affinité ActRIIB.

- Le Stamulumab (anciennement MYO-029) de Wyeth Pharmaceuticals est un anticorps recombinant de l'immunoglobuline humaine G (IgG)1(λ) développé pour le traitement des dystrophies musculaires. Son développement a été interrompu lors de l'étude clinique de phase II en janvier 2007 à cause d'un manque d'efficacité (107).

- Le Landogrozumab (LY2495655) est un anticorps monoclonal humanisé mis au point par Eli Lilly & Co. Plusieurs essais cliniques de phase II ont été menés sur cette molécule (107).
- Le Trévogrumab (REGN-1033) est né de la collaboration entre Regeneron Pharmaceuticals Ins. et Sanofi. Il contient une région constante d'IgG4. Les essais cliniques de phase II chez des patients sarcopéniques ont été achevés en février 2015 et des évaluations de l'efficacité sont actuellement en cours (107).
- Le Domagrozumab de Pfizer (PF-06252616) est un anticorps monoclonal en cours de développement, destiné à la perfusion intraveineuse. PF-06252616 a obtenu le statut de médicament orphelin par l'Agence Européenne du Médicament (EMA) en juillet 2012 (107).

III.2.1.2 Peptide anti-myostatine

Le PINTA-745 (anciennement nommé AMG-745) est un peptide anti-myostatine mis au point par la société américaine Amgen. Il s'agit d'une protéine de fusion avec un fragment constant Fc humain au niveau N-terminal et un peptide bioactif neutralisant la myostatine au niveau C-terminal. Les essais cliniques de phase I/II ont été achevés en janvier 2016 mais le développement d'AMG-745 a été arrêté car il ne respectait pas les critères d'efficacité (107).

III.2.1.3 Anticorps anti-activine A

Le REGN-2477 de Regeneron Pharmaceuticals est un anticorps dirigé contre l'activine, un autre agoniste du récepteur ActRIIB. REGN-2477 a obtenu le statut de médicament orphelin par l'EMA dans le traitement de la fibrodysplasie ossifiante progressive en novembre 2016. Il est actuellement en phase de test chez des volontaires sains (107).

III.2.1.4 ActRIIB-Fc / Protéines de fusion recombinantes

Ces molécules se lient à plusieurs ligands ActRIIB et agissent en tant que récepteurs leurres pour bloquer leur interaction avec les récepteurs ActRIIB.

- Ramatercept (ACE-031), développé par Acceleron Pharma, est une forme soluble du récepteur ActRIIB qui se lie à la plupart des ligands de ce dernier. C'est une protéine de fusion composée du domaine extracellulaire de l'ActRIIB humain lié à la partie Fc de l'immunoglobuline humaine G1 (IgG1) (108). ACE-031 a obtenu le statut de médicament orphelin dans le traitement des dystrophies musculaires par la Food and Drug Administration (FDA) en 2010. Toutefois, son développement a été interrompu en raison de problèmes de sécurité tels que des saignements de nez (107).
- L'ACE-083, aussi développé par Acceleron Pharma, est un médicament expérimental servant également de piège à ligands pour les membres de la superfamille des TGF- β . Contrairement à ACE-031, il ne lie pas les ligands BMP9 et BMP10. ACE-083 fait actuellement l'objet d'essais cliniques de phase II (107).

III.2.1.5 Adnectine anti-myostatine

Bristol-Meyers-Squibb a mis au point un mimétique d'anticorps, appelé adnectine anti-myostatine, le BMS-986089. Les adnectines sont des protéines de liaison synthétiques construites à l'aide du dixième domaine de la fibronectine de type III (FN3) en tant qu'échafaudage moléculaire. BMS-986089 présente une forte affinité pour la myostatine. Les essais cliniques de phase I et II sont en cours (107).

III.2.1.6 Anticorps anti-ActRIIB

Le bimagrumab (BYM-338) est un anticorps monoclonal humain développé pour se lier de manière compétitive à ActRIIB avec une affinité supérieure à celle de ses ligands naturels, la myostatine et l'activine A. BYM-338 est actuellement développé par Novartis. Les essais cliniques de phase II et III chez des patients atteints de myosite sporadiques à corps d'inclusion ont été achevés en janvier 2016 et sont en cours de révision (107).

III.2.4 Inhibiteurs de la NCoR-1

Les co-régulateurs de l'expression des gènes de la biogénèse mitochondriale comprennent des co-activateurs, tels que PGC-1 α , mais aussi des co-répresseurs comme le co-répresseur des récepteurs nucléaires 1 (NCoR-1). Dans des conditions physiologiques, NCoR-1 réprime la transcription des gènes de la biogénèse mitochondriale en cas d'excès calorique. L'inactivation de NCoR-1 dans les muscles squelettiques de souris (*NCoRI^{skm-/-}*) a considérablement amélioré la capacité d'exercice des rongeurs. Ceci résultait de l'induction de gènes impliqués dans la biogénèse mitochondriale, et médiés par les voies PPARs et ERRs, provoquant une augmentation de la masse musculaire et un déplacement du type de fibre musculaire vers des fibres plus oxydantes. La régulation à la baisse de NCoR-1 a donc été considérée comme un moyen viable de moduler et d'améliorer la fonction musculaire. Cependant aucune molécule affectant immédiatement NCoR-1 n'a encore été rapportée à ce jour. L'interférence pharmacologique avec ce co-répresseur est considérée comme une potentielle option de modulation de la fonction musculaire (109).

III.3 Obstacles à la détection des utilisateurs

Alimentés par les nouveaux développements pharmaceutiques, par l'inventivité et le manque de scrupule des producteurs et fournisseurs de médicaments sur le marché noir, le nombre et la diversité des substances susceptibles d'améliorer les performances augmente constamment. Comme nous le verrons dans la partie III.4, certaines molécules présentées précédemment ont fait l'objet d'abus dans le sport, ce qui démontre la nécessité d'un suivi attentif et proactif des programmes de développement de médicaments ainsi qu'une mise à jour continue des méthodes analytiques de contrôle antidopage. Ces candidats-médicaments sont vendus par des fournisseurs basés sur internet malgré l'absence d'approbation clinique, voir même l'interruption de leurs développements en raison d'effets secondaires graves. La mise en œuvre de nouveaux protocoles de tests antidopage requiert une quantité importante d'informations afin de garantir la sensibilité et la spécificité requises pour la détection de l'analyte cible avec des limites de détection appropriées. Dans un premier temps il est indispensable de

connaître les propriétés physico-chimiques spécifiques d'une molécule, de manière à déterminer les conditions de collecte, de transport et de préparation optimales des échantillons. Le budget, le personnel, l'instrumentation des laboratoires et les temps d'analyses n'étant pas extensibles, les laboratoires d'analyses sportives sont priés de combiner le plus grand nombre de tests possibles sans compromettre les exigences analytiques. Alors que les anciennes classes de médicaments dictaient la composition des tests analytiques, de nos jours l'équipement d'analyse disponible régit généralement les stratégies de test utilisées. Les protocoles de collecte suivent des règles strictes nécessitant des personnels de contrôles antidopage formés. Les temps et les conditions de transport doivent être contrôlés et documentés, y compris dans le cas des échantillons de sang pour le Passeport Biologique de l'Athlète (PBA), où des délais de transport et d'analyse sont également appliqués. Le stockage des échantillons doit être assuré pendant 10 ans pour permettre leur réanalyse si nécessaire (110). Le nombre limité d'informations sur le métabolisme et l'élimination de ces nouvelles entités médicamenteuses complique les analyses anti-dopage. Il est nécessaire d'effectuer préalablement des études *in vitro* pour déterminer les processus métaboliques des composés. Ces études permettent d'identifier les métabolites de phase I et II des médicaments ainsi que les fenêtres de détection de chacune de ces molécules. Les réactions de phase I (oxydations, hydrolyses et réductions) constituent le point de départ des investigations *in vitro*. Comme le montre la Figure 56, les médicaments intacts et leurs métabolites *in vitro* sont ensuite soumis à des analyses spectrométriques déterminant les spectres de masse des ions produits. La dissociation induite par collision (CID) par electrospray en mode positif suivie d'une chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS) est la technique d'analyse la plus utilisée pour ces composés.

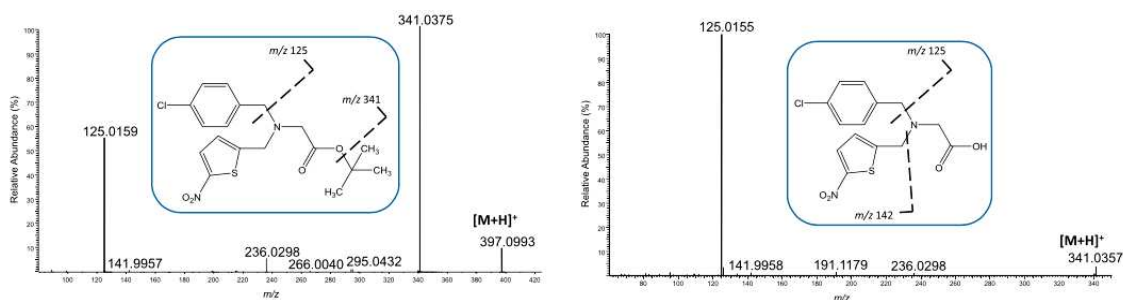


Figure 56 : Spectres de masses des ions générés à partir des molécules protonées $[M+H]^+$ de GSK4112 et de l'un de ses dérivés métaboliques *in vitro* (50)

In vivo, on ne retrouve souvent que quelques métabolites urinaires de phase I, les médicaments intacts peuvent être absents des prélèvements. La difficulté de la détermination des spectres de masse des ions de tous les dérivés métaboliques d'un médicament présents dans les urines d'un athlète, représente un obstacle non négligeable à la lutte antidopage. De plus, certains de ces métabolites ne sont détectables dans les urines que quelques jours après la prise du médicament (48 à 120h pour les ligands REV-ERB et 4j pour les STACs). Dans le cas de l'AICAR, des précurseurs du NAD et de MOTS-c, molécules naturellement présentes chez l'homme, une quantification de l'analyte par spectrométrie de masse utilisant la technique de dilution isotopique s'avérera nécessaire. Il s'agira ici de caractériser l'origine endogène ou exogène de ces molécules. La spectrométrie de masse à rapport isotopique du carbone (IRMS) est utilisée pour distinguer l'AICAR endogène de l'AICAR exogène (50). Les concentrations physiologiques d'AICAR quantifiées sur des populations d'athlètes ont révélé une corrélation significative entre le niveau urinaire d'AICAR, le sexe, le sport exercé (d'endurance ou de force par exemple) et l'heure de collecte de l'échantillon (en compétition ou hors compétition). Une valeur moyenne comprise entre 2200 ng/mL et 3500 ng/mL a été retenue. Le profil intra-individuel des concentrations d'AICAR pourrait constituer une contribution utile au Passeport Biologique des Athlètes (PBA) afin de détecter toute dérive potentielle (110).

En ce qui concerne les anticorps neutralisant la myostatine, un test de détection immunologique qualitatif a été mis en place. Ce test spécifique des anticorps dirigés contre la myostatine possédant un fragment Fc humain utilise la combinaison des stratégies de purification par affinité et de Western Blot. Son principe est illustré schématiquement par la figure 57 : la protéine de myostatine appât est séparée au moyen d'une électrophorèse en gel polyacrylamide contenant du laurylsulfate de sodium (SDS-PAGE) et transférée sur une membrane en polyfluorure de vinylidène (PVDF). Simultanément l'échantillon de plasma ou de sérum de l'athlète est soumis à une purification par affinité et les IgG sont isolées de la matrice biologique à l'aide de billes magnétiques. La membrane de transfert contenant la protéine d'appât est ensuite incubée avec les anticorps extraits. Les anticorps neutralisant la myostatine présents dans l'échantillon se lient alors à l'antigène et sont détectés à l'aide d'un anticorps secondaire lié à une enzyme spécifique du fragment Fc d'IgG humaine. En raison de leur poids moléculaire élevé, seules des quantités infimes d'IgG endogènes et

thérapeutiques sont éliminées par les reins et excrétées dans les urines. Le plasma et le sérum sont donc les matrices privilégiées pour la détection des anticorps neutralisant la myostatine dans les tests antidopage (111).

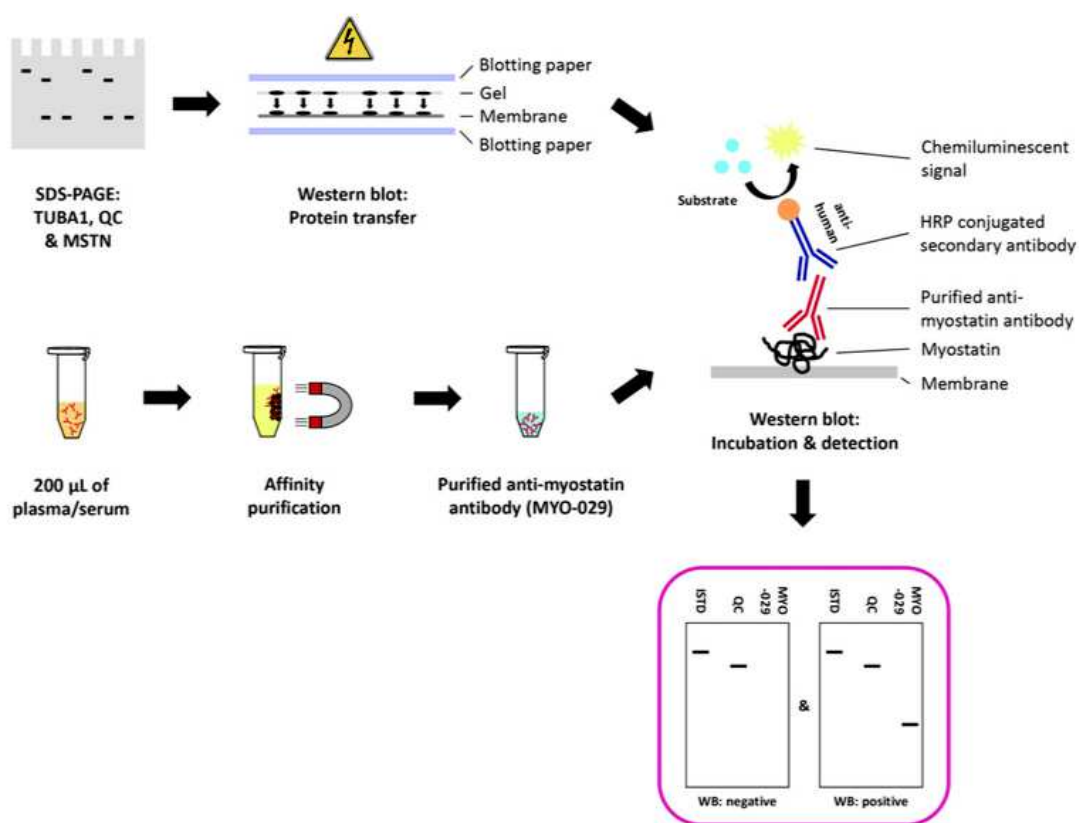


Figure 57 : Représentation schématique du test de détection immunologique des anticorps neutralisant la myostatine (111)

III.4 Les cas de sportifs positifs déclarés par l'AMA à ce jour

L'ensemble des molécules décrites précédemment n'étant pas commercialisées à des buts thérapeutiques, elles appartiennent à la partie S0 « *Substances non approuvées* » de la liste des interdictions de l'Agence Mondiale Antidopage (AMA). La dernière mise à jour de cette liste, parue en janvier 2019 regroupe dans la partie S0 « *Toute substance pharmacologique non incluse dans une section de la Liste ci-dessous et qui n'est pas actuellement approuvée pour une utilisation thérapeutique chez l'Homme par une autorité gouvernementale réglementaire de la santé (par ex. médicaments en développement préclinique ou clinique ou médicaments discontinués,*

médicaments à façon, substances approuvées seulement pour usage vétérinaire) est interdite en permanence ». Leur utilisation est donc totalement interdite en et hors compétition. La plupart de ces candidats-médicaments peuvent aussi être classés dans la partie S4.5.1 « Modulateurs hormonaux et métaboliques / Activateurs de la protéine kinase activée par l'AMP (AMPK), par ex. AICAR, SR9009 ; et agonistes du récepteur activé par les proliférateurs des péroxysomes δ (PPAR δ), par ex. acide 2-(2-méthyl-4-((4-méthyl-2-(4-(trifluorométhyl)phényl)thiazol-5-yl)méthylthio)phénoxy) acétique (GW 1516, GW501516) ». Les inhibiteurs de la myostatine sont quant à eux inclus dans la partie S4.4 « Modulateurs hormonaux et métaboliques / Agents prévenant l'activation du récepteur IIB de l'activine, incluant sans s'y limiter : les anticorps neutralisant l'activine A ; les anticorps anti-récepteurs IIB de l'activine (par ex. bimagrumab) ; les compétiteurs du récepteur IIB de l'activine par ex. récepteurs leurres de l'activine (par ex. ACE 031) ; les inhibiteurs de la myostatine tels que : les agents réduisant ou supprimant l'expression de la myostatine ; les anticorps neutralisant la myostatine (par ex. domagrozumab, landogrozumab, stamulumab) ; les protéines liant la myostatine (par ex. follistatine, propeptide de la myostatine) ». Enfin, les agonistes ERR peuvent être aussi classés dans la partie S4.3 « Modulateurs hormonaux et métaboliques / Autres substances anti-œstrogéniques, incluant sans s'y limiter : Clomifène ; Cyclofénil ; Fulvestrant » (112).

Parmi les molécules que nous venons de détailler dans cette thèse, une seule figure dans les rapports des données de contrôles antidopage analysés par les laboratoires accrédités par l'AMA et rapportés dans le système de gestion et d'administration antidopage (ADAMS). Il s'agit d'un agoniste PPAR δ , le GW1516, substance interdite en et hors compétition depuis 2009 et retrouvée dans plusieurs échantillons depuis 2012. Aucun résultat d'analyse anormal pour une autre molécule présenté précédemment n'a été rapporté par l'AMA. Le nombre d'échantillons positifs à ce produit a connu un premier pic en 2013 (11 cas), il est ensuite resté assez faible pendant 3 ans avant de connaître une forte hausse en 2017 avec pas moins de 31 cas (Tableau 4). Cependant ces chiffres doivent être considérés avec un certain recul, l'AMA insiste sur le fait que « ces résultats d'analyses anormaux ne doivent pas être confondus avec les violations des règles antidopage (ADRV) jugées ou sanctionnées, car les chiffres fournis dans ces rapports peuvent contenir des résultats ayant abouti au processus d'approbation de l'autorisation d'usage à des fins thérapeutiques (AUT), ou

plusieurs constatations sur le même athlète ». Parmi les 11 cas dénombrés en 2013 on retrouve 5 cyclistes, contrôlés positifs au GW1516 en l'espace d'une semaine. Il s'agit de Vargas Barrantes, Mudarra Segura, Morales Castillo, Villalobos Azofeifa et Valery Kaykov. Les 4 premiers ayant été contrôlés lors de la Vuelta du Costa Rica (113). Ces annonces arrivent trois semaines seulement après l'alerte publiée par l'AMA le 21 mars 2013 et transmise à l'AFP et auprès de multiples institutions de lutte anti-dopage à travers le monde, déclarant que les effets secondaires de cette molécule étaient si graves « *qu'elle a décidé exceptionnellement d'alerter les « tricheurs », afin de s'assurer que ceux qui succombent à la tentation d'utiliser le GW501516 pour améliorer leur performance soient pleinement sensibilisés à ses dangers pour la santé. L'AMA a été informée que la substance interdite GW501516 était vendue sur le marché noir et utilisée par certains sportifs. Le GW501516 était une substance en développement dont les travaux de recherche ont été suspendus par la compagnie pharmaceutique GlaxoSmithKline, puis arrêtés lorsque de graves signes de toxicité ont été observés au cours d'études précliniques conduites sur des rats. Cette substance n'a jamais été - et ne sera jamais - homologuée* » (114).

Les données de 2017 indiquent une augmentation de 7,1% du nombre total d'échantillons analysés, passant de 300 565 en 2016 à 322 050 en 2017 (*Figure 58*), ce qui tend à augmenter le nombre d'échantillons positif au GW1516 mais n'explique toutefois pas la hausse de 520% observée entre 2016 et 2017 (5 cas en 2016 pour 31 en 2017) (115).

Année	Nombre de cas
2012	1
2013	11
2014	4
2015	6
2016	5
2017	31

Tableau 4 : Evolution du nombre de résultats d'analyses anormaux au GW1516 entre 2012 et 2017 (115)

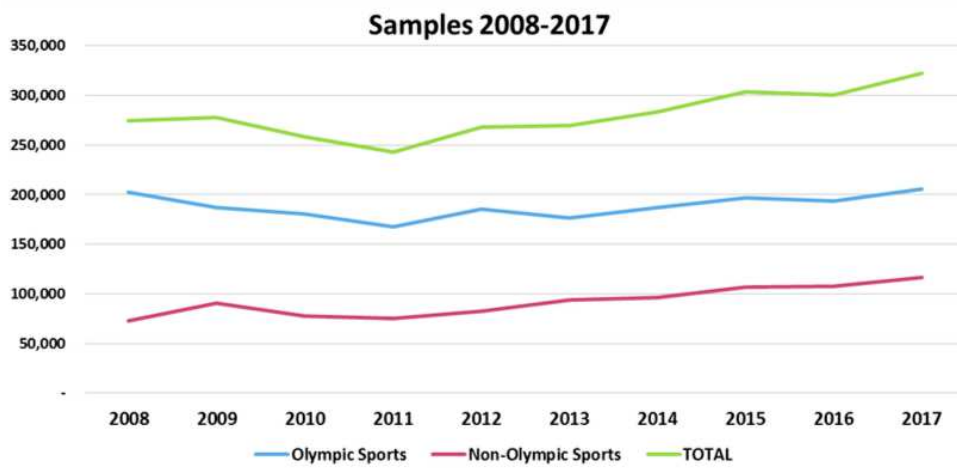


Figure 58 : Evolution du nombre d'échantillons analysés par l'AMA entre 2008 et 2017 (115)

CONCLUSION

Le XXI^{ème} siècle voit le dopage entrer dans une nouvelle ère, celle du dopage génétique. Ce dernier rend superflu les méthodes de dopage classique, il transforme le corps en sa propre usine de dopage. La science ne cesse de découvrir de nouveaux gènes importants pour la performance physique et un arsenal de molécules capables de stimuler leurs transcriptions est en train de voir le jour.

Les connaissances sur la physiologie du muscle strié squelettique et sur son organite clé, la mitochondrie, se sont multipliées au cours de ces dernières années. Les mitochondries se comportent comme un véritable moteur pour le myocyte, ce sont elles qui transforment l'oxygène en énergie. La stimulation de leur biogénèse s'est avérée être un atout majeur pour le fonctionnement de la fibre musculaire et a donc fait l'objet de nombreuses recherches par les laboratoires pharmaceutiques dans le cadre de la lutte contre les maladies neuromusculaires. La myostatine, cytokine inhibant la différenciation terminale des cellules musculaires, a aussi été très largement étudiée. De nombreux candidats-médicaments actifs sur différents maillons de la régulation de la biogénèse mitochondriale et musculaire ont ainsi vu le jour. La quasi-totalité de ces molécules est encore à l'étude et n'est donc pas commercialisée mais certaines d'entre-elles comme l'AICAR et le GW1516 ont déjà fait l'objet de dérives dans le sport.

Les molécules que nous venons de détailler dans cette thèse sont capables de mimer les bénéfices d'un exercice physique prolongé et permettent ainsi aux potentiels utilisateurs d'augmenter considérablement leur endurance. Cependant elles présentent pour la plupart des effets indésirables graves tels que l'apparition de tumeurs malignes, mettant souvent un point d'arrêt à leur développement. Au vu de ces deux arguments, l'AMA a inscrit ces candidats-médicaments sur la liste des substances interdites en et hors compétition.

Malgré la connaissance de l'existence de ces molécules, la mise en œuvre de nouveaux protocoles de tests antidopage pour chacune d'elles s'avère être un défi très compliqué à relever pour les autorités compétentes. En plus des difficultés déjà rencontrées telles que la méconnaissance des différents mécanismes métaboliques des

produits et l'impossibilité de découpler les moyens logistiques déjà en place, les familles de médicaments que nous venons d'étudier sont vouées à s'agrandir et donc à multiplier les obstacles rencontrés par les laboratoires.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Larousse É. Définitions : dopage - Dictionnaire de français Larousse [Internet]. [cité 3 avr 2019]. Disponible sur: <https://www.larousse.fr/dictionnaires/francais/dopage/26452>
2. Chris Hesson. Chapter 01 Power Points [Internet]. Education présenté à: 12:35:19 UTC [cité 20 févr 2018]. Disponible sur: <https://www.slideshare.net/chesson/chapter-01-power-points>
3. Larousse É. Définitions : homéostasie - Dictionnaire de français Larousse [Internet]. [cité 17 févr 2018]. Disponible sur: <http://www.larousse.fr/dictionnaires/francais/hom%C3%A9ostasie/40213>
4. Sherwood L. Physiologie humaine. De Boeck;
5. Chapitre 1. Le muscle squelettique [Internet]. [cité 17 févr 2018]. Disponible sur: <http://theses.ulaval.ca/archimede/fichiers/21784/ch02.html>
6. Les filaments fins La tropomyosine - ppt télécharger [Internet]. [cité 21 févr 2018]. Disponible sur: <http://slideplayer.fr/slide/2939838/>
7. svtlan.info | Thème 3 : Energie et cellule eucaryote [Internet]. [cité 18 févr 2018]. Disponible sur: <https://www.svtlan.info/energie-et-cellule-vivante-eucaryote>
8. 1997_10_1189.pdf [Internet]. [cité 21 févr 2018]. Disponible sur: http://www.ipubli.inserm.fr/bitstream/handle/10608/529/1997_10_1189.pdf?sequence=2
9. Sarcomere - Wikipedia [Internet]. [cité 18 févr 2018]. Disponible sur: <https://en.wikipedia.org/wiki/Sarcomere>
10. Biotop terminologie médicale, lexique médical, dictionnaire médical, termes commençant par la lettre F [Internet]. [cité 18 févr 2018]. Disponible sur: <https://www.bio-top.net/Terminologie/T/index.php?page=tropo>
11. ThingLink. Neuromuscular Junction by [Internet]. [cité 20 févr 2018]. Disponible sur: <https://www.thinglink.com/scene/648196519761018880>
12. What makes Ca²⁺ ions bind to actin longer on slow muscle fibers than on fast muscle fibers? - Quora [Internet]. [cité 21 févr 2018]. Disponible sur: <https://www.quora.com/What-makes-Ca2+-ions-bind-to-actin-longer-on-slow-muscle-fibers-than-on-fast-muscle-fibers>
13. Conversion de l'énergie chimique des plantes en énergie musculaire | Encyclopédie de l'Energie [Internet]. [cité 21 févr 2018]. Disponible sur: <http://encyclopedie-energie.org/articles/conversion-de-l%E2%80%99%C3%A9nergie-chimique-des-plantes-en-%C3%A9nergie-musculaire>
14. Rodwell V, Bender D, Botham K, Kennelly P, Weil A. Biochimie de Harper. De Boeck.
15. Intradialytic creatine supplementation: A scientific rationale for improving the health and quality of life of dialysis patients - ScienceDirect [Internet]. [cité 22 févr 2018]. Disponible sur: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0306987716307204>
16. cellular-respiration - Oxidative Phosphorylation [Internet]. [cité 25 févr 2018]. Disponible sur: <https://cellular-respiration.wikispaces.com/Oxidative+Phosphorylation>
17. Busch K, Ninnemann H. The controlling influence of ADP, ATP and magnesium on the activities of adenylate kinase, ATP synthase, ADP/ATP translocator and the mitochondrial respiration in plants. Plant Sci - PLANT SCI. 1 sept 1997;128:85-95.

18. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Morgan D. *Biologie moléculaire de la cellule*. Médecine Sciences Publications; 2017.
19. Castagné L. *Les mécanismes d'action du PPAR delta*. Antenne Médicale de Prévention du Dopage (AMPD) du Languedoc Roussillon; 2013.
20. Carnac G. *Réparation et régénération du muscle squelettique adulte*.
21. Chargé SBP, Rudnicki MA. Cellular and Molecular Regulation of Muscle Regeneration. *Physiol Rev*. janv 2004;84(1):209-38.
22. Point Sur Myostatine [Internet]. Scribd. [cité 5 juill 2018]. Disponible sur: <https://www.scribd.com/document/65102635/Point-Sur-Myostatine>
23. McPherron AC, Lawler AM, Lee SJ. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member. *Nature*. 1 mai 1997;387(6628):83-90.
24. Grobet L, Martin LJ, Poncelet D, Pirottin D, Brouwers B, Riquet J, et al. A deletion in the bovine myostatin gene causes the double-muscling phenotype in cattle. *Nat Genet*. sept 1997;17(1):71-4.
25. Kambadur R, Sharma M, Smith TPL, Bass JJ. Mutations in myostatin (GDF8) in Double-Muscling Belgian Blue and Piedmontese Cattle. *Genome Res*. 9 janv 1997;7(9):910-5.
26. McPherron AC, Lee S-J. Double muscling in cattle due to mutations in the myostatin gene. *Proc Natl Acad Sci*. 11 nov 1997;94(23):12457-61.
27. Grobet L, Poncelet D, Royo LJ, Brouwers B, Pirottin D, Michaux C, et al. Molecular definition of an allelic series of mutations disrupting the myostatin function and causing double-muscling in cattle. *Mamm Genome Off J Int Mamm Genome Soc*. mars 1998;9(3):210-3.
28. Myostatin mutation associated with gross muscle hypertrophy in a child. - PubMed - NCBI [Internet]. [cité 5 juill 2018]. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15215484?dopt=Abstract>
29. MSTN Gene - GeneCards | GDF8 Protein | GDF8 Antibody [Internet]. [cité 9 juill 2018]. Disponible sur: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=MSTN>
30. Gonzalez-Cadavid NF, Taylor WE, Yarasheski K, Sinha-Hikim I, Ma K, Ezzat S, et al. Organization of the human myostatin gene and expression in healthy men and HIV-infected men with muscle wasting. *Proc Natl Acad Sci*. 8 déc 1998;95(25):14938-43.
31. Anderson SB, Goldberg AL, Whitman M. Identification of a Novel Pool of Extracellular Pro-myostatin in Skeletal Muscle. *J Biol Chem*. 14 mars 2008;283(11):7027-35.
32. Huang Z, Chen X, Chen D. Myostatin: A novel insight into its role in metabolism, signal pathways, and expression regulation. *Cell Signal*. sept 2011;23(9):1441-6.
33. Cash JN, Angerman EB, Kattamuri C, Nolan K, Zhao H, Sidis Y, et al. Structure of Myostatin·Follistatin-like 3. *J Biol Chem*. 6 janv 2012;287(2):1043-53.
34. McFarlane C, Hui GZ, Amanda WZW, Lau HY, Lokireddy S, XiaoJia G, et al. Human myostatin negatively regulates human myoblast growth and differentiation. *Am J Physiol - Cell Physiol*. juill 2011;301(1):C195-203.
35. Langley B, Thomas M, Bishop A, Sharma M, Gilmour S, Kambadur R. Myostatin Inhibits Myoblast Differentiation by Down-regulating MyoD Expression. *J Biol Chem*. 20 déc 2002;277(51):49831-40.
36. Nuclear receptor. In: Wikipedia [Internet]. 2018 [cité 5 août 2018]. Disponible sur: https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Nuclear_receptor&oldid=835937371

37. Kumar R, Thompson EB. The structure of the nuclear hormone receptors. *Steroids*. mai 1999;64(5):310-9.
38. Moussard C. Biologie moléculaire. *Biochimie des communications cellulaires*. De Boeck Supérieur; 2005. 330 p.
39. Andréeva-Gatéva P. Récepteurs activables par les proliférateurs des peroxyosomes (PPAR) : leur implication dans le métabolisme des hydrates de carbone et des lipides. *Ann Biol Clin*. 2003;61:9.
40. Latruffe N. Les peroxyosomes et la prolifération cellulaire ou la prise en considération d'un organe méconnu. *médecine/sciences*. 1992;8(3):239.
41. Tyagi S, Sharma S, Gupta P, Saini A, Kaushal C. The peroxisome proliferator-activated receptor: A family of nuclear receptors role in various diseases. *J Adv Pharm Technol Res*. 2011;2(4):236.
42. Blanquart C. PPAR α (PEROXISOME PROLIFERATOR- ACTIVATED RECEPTOR ALPHA) UN RÉCEPTEUR NUCLÉAIRE IMPLIQUÉ DANS LA RÉGULATION DU MÉTABOLISME DES LIPIDES ET DES LIPOPROTÉINES AINSI QUE DANS LA RÉPONSE INFLAMMATOIRE. :13.
43. Bishop-Bailey D. Peroxisome proliferator-activated receptors in the cardiovascular system. *Br J Pharmacol*. mars 2000;129(5):823-34.
44. Zoete V, Grosdidier A, Michielin O. Peroxisome proliferator-activated receptor structures: Ligand specificity, molecular switch and interactions with regulators. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Biol Lipids*. août 2007;1771(8):915-25.
45. Brown KK, Henke BR, Blanchard SG, Cobb JE, Mook R, Kaldor I, et al. A novel N-aryl tyrosine activator of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma reverses the diabetic phenotype of the Zucker diabetic fatty rat. *Diabetes*. 1 juill 1999;48(7):1415-24.
46. Gervois P, Fruchart J-C. PPAR γ : un récepteur nucléaire majeur de l'adipogénèse. *médecine/sciences*. janv 2003;19(1):20-2.
47. Laracine F. Rôle des Peroxisome Proliferator-Activated Receptors (PPAR) dans le métabolisme lipidique. 2009;106.
48. Wang N. PPAR- δ in Vascular Pathophysiology. *PPAR Res*. 2008;2008:1-10.
49. Ehrenborg E, Krook A. Regulation of Skeletal Muscle Physiology and Metabolism by Peroxisome Proliferator-Activated Receptor. *Pharmacol Rev*. 1 sept 2009;61(3):373-93.
50. Thevis M, Schänzer W. Emerging drugs affecting skeletal muscle function and mitochondrial biogenesis - Potential implications for sports drug testing programs: Emerging drugs - Potential implications for sports drug testing. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 15 mars 2016;30(5):635-51.
51. Fernandez-Marcos PJ, Auwerx J. Regulation of PGC-1 α , a nodal regulator of mitochondrial biogenesis. *Am J Clin Nutr*. 1 avr 2011;93(4):884S-890S.
52. Narkar VA, Downes M, Yu RT, Embler E, Wang Y-X, Banayo E, et al. AMPK and PPAR δ Agonists Are Exercise Mimetics. *Cell*. août 2008;134(3):405-15.
53. Dopage AICAR et GW501516 lettre dopage CHU Montpellier.
54. Woldt E, Sebt Y, Solt LA, Duhem C, Lancel S, Eeckhoutte J, et al. Rev-erb- α modulates skeletal muscle oxidative capacity by regulating mitochondrial biogenesis and autophagy. *Nat Med*. août 2013;19(8):1039-46.
55. Sinclair DA, Guarente L. Small-Molecule Allosteric Activators of Sirtuins. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 6 janv 2014;54(1):363-80.
56. North BJ, Sinclair DA. Sirtuins: a conserved key unlocking AceCS activity.

- Trends Biochem Sci. janv 2007;32(1):1-4.
57. Bheda P, Jing H, Wolberger C, Lin H. The Substrate Specificity of Sirtuins. *Annu Rev Biochem.* 2 juin 2016;85(1):405-29.
 58. Elliott PJ, Jirousek M. Sirtuins: Novel targets for metabolic disease. :8.
 59. Shoba B, Lwin ZM, Ling LS, Bay B-H, Yip GW, Kumar SD. Function of Sirtuins in Biological Tissues. *Anat Rec Adv Integr Anat Evol Biol.* avr 2009;292(4):536-43.
 60. Anderson RM, Bitterman KJ, Wood JG, Medvedik O, Sinclair DA. Nicotinamide and PNC1 govern lifespan extension by calorie restriction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature.* mai 2003;423(6936):181-5.
 61. Lin SJ, Defossez PA, Guarente L. Requirement of NAD and SIR2 for life-span extension by calorie restriction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science.* 22 sept 2000;289(5487):2126-8.
 62. Cohen HY, Miller C, Bitterman KJ, Wall NR, Hekking B, Kessler B, et al. Calorie restriction promotes mammalian cell survival by inducing the SIRT1 deacetylase. *Science.* 16 juill 2004;305(5682):390-2.
 63. Kim SC, Sprung R, Chen Y, Xu Y, Ball H, Pei J, et al. Substrate and functional diversity of lysine acetylation revealed by a proteomics survey. *Mol Cell.* août 2006;23(4):607-18.
 64. Huang J-Y, Hirschev MD, Shimazu T, Ho L, Verdin E. Mitochondrial sirtuins. *Biochim Biophys Acta BBA - Proteins Proteomics.* août 2010;1804(8):1645-51.
 65. Howitz KT, Bitterman KJ, Cohen HY, Lamming DW, Lavu S, Wood JG, et al. Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. *Nature.* sept 2003;425(6954):191-6.
 66. Szczepankiewicz B, Ng P. Sirtuin Modulators: Targets for Metabolic Diseases and Beyond. *Curr Top Med Chem.* 1 nov 2008;8(17):1533-44.
 67. Nayagam VM, Wang X, Tan YC, Poulsen A, Goh KC, Ng T, et al. SIRT1 Modulating Compounds from High-Throughput Screening as Anti-Inflammatory and Insulin-Sensitizing Agents. *J Biomol Screen.* déc 2006;11(8):959-67.
 68. Vu CB, Bemis JE, Disch JS, Ng PY, Nunes JJ, Milne JC, et al. Discovery of Imidazo[1,2- *b*]thiazole Derivatives as Novel SIRT1 Activators. *J Med Chem.* 12 mars 2009;52(5):1275-83.
 69. Carafa V, Rotili D, Forgione M, Cuomo F, Serrettiello E, Hailu GS, et al. Sirtuin functions and modulation: from chemistry to the clinic. *Clin Epigenetics [Internet].* déc 2016 [cité 2 déc 2018];8(1). Disponible sur: <http://clinicalepigeneticsjournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13148-016-0224-3>
 70. Milne JC, Lambert PD, Schenk S, Carney DP, Smith JJ, Gagne DJ, et al. Small molecule activators of SIRT1 as therapeutics for the treatment of type 2 diabetes. *Nature.* nov 2007;450(7170):712-6.
 71. Dai H, Kustigian L, Carney D, Case A, Considine T, Hubbard BP, et al. SIRT1 Activation by Small Molecules. *J Biol Chem.* 22 oct 2010;285(43):32695-703.
 72. Bieganski P, Brenner C. Discoveries of Nicotinamide Riboside as a Nutrient and Conserved NRK Genes Establish a Preiss-Handler Independent Route to NAD+ in Fungi and Humans. *Cell.* mai 2004;117(4):495-502.
 73. Nicotinamide adénine dinucléotide. In: Wikipédia [Internet]. 2018 [cité 8 janv 2019]. Disponible sur: https://fr.wikipedia.org/w/index.php?title=Nicotinamide_ad%C3%A9nine_dinucl%C3%A9otide

- %A9otide&oldid=153739096
74. Cantó C, Houtkooper RH, Pirinen E, Youn DY, Oosterveer MH, Cen Y, et al. The NAD⁺ precursor nicotinamide riboside enhances oxidative metabolism and protects against high-fat diet induced obesity. *Cell Metab.* 6 juin 2012;15(6):838-47.
 75. Nicotinamide riboside. In: Wikipedia [Internet]. 2018 [cité 8 janv 2019]. Disponible sur: https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Nicotinamide_ribose&oldid=852530166
 76. Iwabu M, Yamauchi T, Okada-Iwabu M, Sato K, Nakagawa T, Funata M, et al. Adiponectin and AdipoR1 regulate PGC-1 α and mitochondria by Ca²⁺ and AMPK/SIRT1. *Nature.* avr 2010;464(7293):1313-9.
 77. Otvos L, Knappe D, Hoffmann R, Kovalszky I, Olah J, Hewitson TD, et al. Development of second generation peptides modulating cellular adiponectin receptor responses. *Front Chem* [Internet]. 17 oct 2014 [cité 15 janv 2019];2. Disponible sur: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fchem.2014.00093/abstract>
 78. Sun Y, Zang Z, Zhong L, Wu M, Su Q, Gao X, et al. Identification of Adiponectin Receptor Agonist Utilizing a Fluorescence Polarization Based High Throughput Assay. *Tasken K, éditeur. PLoS ONE.* 14 mai 2013;8(5):e63354.
 79. Otvos L, Haspinger E, La Russa F, Maspero F, Graziano P, Kovalszky I, et al. Design and development of a peptide-based adiponectin receptor agonist for cancer treatment. *BMC Biotechnol.* 2011;11(1):90.
 80. Okada-Iwabu M, Yamauchi T, Iwabu M, Honma T, Hamagami K, Matsuda K, et al. A small-molecule AdipoR agonist for type 2 diabetes and short life in obesity. *Nature.* nov 2013;503(7477):493-9.
 81. Lin J, Wu H, Tarr PT, Zhang C-Y, Wu Z, Boss O, et al. Transcriptional co-activator PGC-1 α drives the formation of slow-twitch muscle fibres. 2002;418:5.
 82. Krämer DK, Ahlsén M, Norrbom J, Jansson E, Hjeltnes N, Gustafsson T, et al. Human skeletal muscle fibre type variations correlate with PPAR α , PPAR β and PGC-1 α mRNA. *Acta Physiol.* nov 2006;188(3-4):207-16.
 83. Constantin-Teodosiu D, Baker DJ, Constantin D, Greenhaff PL. PPAR δ agonism inhibits skeletal muscle PDC activity, mitochondrial ATP production and force generation during prolonged contraction: PPAR δ agonism and fuel metabolism in contracting muscle. *J Physiol.* 1 janv 2009;587(1):231-9.
 84. Liou J-Y, Lee S, Ghelani D, Matijevic-Aleksic N, Wu KK. Protection of Endothelial Survival by Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- δ Mediated 14-3-3 Upregulation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* juill 2006;26(7):1481-7.
 85. Stephen RL, Gustafsson MCU, Jarvis M, Tatoud R, Marshall BR, Knight D, et al. Activation of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ Stimulates the Proliferation of Human Breast and Prostate Cancer Cell Lines. :10.
 86. Gaudel C, Schwartz C, Giordano C, Abumrad NA, Grimaldi PA. Pharmacological activation of PPAR β promotes rapid and calcineurin-dependent fiber remodeling and angiogenesis in mouse skeletal muscle. *Am J Physiol - Endocrinol Metab.* août 2008;295(2):E297-304.
 87. Müller-Brüsselbach S, Kömhoff M, Rieck M, Meissner W, Kaddatz K, Adamkiewicz J, et al. Dereglulation of tumor angiogenesis and blockade of tumor growth in PPAR β -deficient mice. *EMBO J.* 8 août 2007;26(15):3686-98.
 88. Lim H-J, Lee S, Park J-H, Lee K-S, Choi H-E, Chung K-S, et al. PPAR δ agonist L-165041 inhibits rat vascular smooth muscle cell proliferation and migration via inhibition of cell cycle. *Atherosclerosis.* févr 2009;202(2):446-54.
 89. Barish GD, Atkins AR, Downes M, Olson P, Chong L-W, Nelson M, et al.

- PPAR regulates multiple proinflammatory pathways to suppress atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci.* 18 mars 2008;105(11):4271-6.
90. Oliver WR, Shenk JL, Snaith MR, Russell CS, Plunket KD, Bodkin NL, et al. A selective peroxisome proliferator-activated receptor agonist promotes reverse cholesterol transport. *Proc Natl Acad Sci.* 24 avr 2001;98(9):5306-11.
 91. van der Veen JN, Kruit JK, Havinga R, Baller JFW, Chimini G, Lestavel S, et al. Reduced cholesterol absorption upon PPAR δ activation coincides with decreased intestinal expression of NPC1L1. *J Lipid Res.* mars 2005;46(3):526-34.
 92. Leibowitz MD, Fiévet C, Hennuyer N, Peinado-Onsurbe J, Duez H, Berger J, et al. Activation of PPAR δ alters lipid metabolism in db/db mice. *FEBS Lett.* 19 mai 2000;473(3):333-6.
 93. Lee C-H, Olson P, Hevener A, Mehl I, Chong L-W, Olefsky JM, et al. PPAR regulates glucose metabolism and insulin sensitivity. *Proc Natl Acad Sci.* 28 févr 2006;103(9):3444-9.
 94. Zuercher WJ, Gaillard S, Orband-Miller LA, Chao EYH, Shearer BG, Jones DG, et al. Identification and Structure-Activity Relationship of Phenolic Acyl Hydrazones as Selective Agonists for the Estrogen-Related Orphan Nuclear Receptors ERR β and ERR γ . *J Med Chem.* mai 2005;48(9):3107-9.
 95. Greschik H, Wurtz J-M, Sanglier S, Bourguet W, van Dorsselaer A, Moras D, et al. Structural and Functional Evidence for Ligand-Independent Transcriptional Activation by the Estrogen-Related Receptor 3. *Mol Cell.* févr 2002;9(2):303-13.
 96. Lang IA, Galloway TS, Scarlett A, Henley WE, Depledge M, Wallace RB, et al. Association of Urinary Bisphenol A Concentration With Medical Disorders and Laboratory Abnormalities in Adults. :8.
 97. Rangwala SM, Wang X, Calvo JA, Lindsley L, Zhang Y, Deyneko G, et al. Estrogen-related Receptor γ Is a Key Regulator of Muscle Mitochondrial Activity and Oxidative Capacity. *J Biol Chem.* 16 juill 2010;285(29):22619-29.
 98. Wellen KE, Hatzivassiliou G, Sachdeva UM, Bui TV, Cross JR, Thompson CB. ATP-Citrate Lyase Links Cellular Metabolism to Histone Acetylation. *Science.* 22 mai 2009;324(5930):1076-80.
 99. Biel M, Kretsovali A, Karatzali E, Papamatheakis J, Giannis A. Design, Synthesis, and Biological Evaluation of a Small-Molecule Inhibitor of the Histone Acetyltransferase Gcn5. *Angew Chem Int Ed.* 26 juill 2004;43(30):3974-6.
 100. Chimenti F, Bizzarri B, Maccioni E, Secci D, Bolasco A, Chimenti P, et al. A Novel Histone Acetyltransferase Inhibitor Modulating Gcn5 Network: Cyclopentylidene-[4-(4'-chlorophenyl)thiazol-2-yl]hydrazone. *J Med Chem.* 22 janv 2009;52(2):530-6.
 101. Lee C, Zeng J, Drew BG, Sallam T, Martin-Montalvo A, Wan J, et al. The Mitochondrial-Derived Peptide MOTS-c Promotes Metabolic Homeostasis and Reduces Obesity and Insulin Resistance. *Cell Metab.* mars 2015;21(3):443-54.
 102. Monestier O, Brun C, Heu K, Passet B, Malhouroux M, Magnol L, et al. Ubiquitous Gasp1 overexpression in mice leads mainly to a hypermuscular phenotype. *BMC Genomics.* 2012;13(1):541.
 103. Laurentino GC, Ugrinowitsch C, Roschel H, Aoki MS, Soares AG, Neves M, et al. Strength Training with Blood Flow Restriction Diminishes Myostatin Gene Expression. *Med Sci Sports Exerc.* mars 2012;44(3):406-12.
 104. Hulmi JJ, Ahtiainen JP, Kaasalainen T, P??Llanen E, Hakkinen K, Alen M, et al. Postexercise Myostatin and Activin Iib mRNA Levels: Effects of Strength Training.

- Med Sci Sports Exerc. févr 2007;39(2):289-97.
105. Saremi A, Gharakhanloo R, Sharghi S, Gharaati MR, Larijani B, Omidfar K. Effects of oral creatine and resistance training on serum myostatin and GASP-1. *Mol Cell Endocrinol*. 12 avr 2010;317(1-2):25-30.
 106. Smith RC, Lin BK. Myostatin inhibitors as therapies for muscle wasting associated with cancer and other disorders: *Curr Opin Support Palliat Care*. nov 2013;7(4):352-60.
 107. Saitoh M, Ishida J, Ebner N, Anker SD, Von Haehling S. Myostatin inhibitors as pharmacological treatment for muscle wasting and muscular dystrophy. *JCSM Clin Rep* [Internet]. 18 oct 2017 [cité 19 févr 2019];2(1). Disponible sur: <https://jcsm-clinical-reports.info/index.php/jcsm-cr/article/view/37>
 108. Campbell C, McMillan HJ, Mah JK, Tarnopolsky M, Selby K, McClure T, et al. Myostatin inhibitor ACE-031 treatment of ambulatory boys with Duchenne muscular dystrophy: Results of a randomized, placebo-controlled clinical trial: Myostatin Inhibitor in DMD. *Muscle Nerve*. avr 2017;55(4):458-64.
 109. Yamamoto H, Williams EG, Mouchiroud L, Cantó C, Fan W, Downes M, et al. NCoR1 Is a Conserved Physiological Modulator of Muscle Mass and Oxidative Function. *Cell*. nov 2011;147(4):827-39.
 110. Thevis M, Schänzer W. Analytical approaches for the detection of emerging therapeutics and non-approved drugs in human doping controls. *J Pharm Biomed Anal*. déc 2014;101:66-83.
 111. Walpurgis K, Thomas A, Schänzer W, Thevis M. Myostatin inhibitors in sports drug testing: Detection of myostatin-neutralizing antibodies in plasma/serum by affinity purification and Western blotting. *PROTEOMICS - Clin Appl*. févr 2016;10(2):195-205.
 112. [wada_2019_french_prohibited_list.pdf](#).
 113. Four riders each handed two year bans for use of GW501516 [Internet]. [cité 18 avr 2019]. Disponible sur: <http://www.velonation.com/news/id/15125/four-riders-each-handed-two-year-bans-for-use-of-gw501516.aspx>
 114. L'AMA diffuse un message d'alerte au GW501516 (21 Mars 2013) [Internet]. Agence mondiale antidopage. 2013 [cité 18 avr 2019]. Disponible sur: <https://www.wada-ama.org/fr/media/nouvelles/2013-03/lama-diffuse-un-message-dalerte-au-gw501516>
 115. Rapport sur les données de contrôle antidopage | Agence mondiale antidopage [Internet]. [cité 17 avr 2019]. Disponible sur: <https://www.wada-ama.org/fr/ressources/laboratoires/rapport-sur-les-donnees-de-controle-antidopage>

SERMENT DE GALIEN

Je jure d'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

D'exercer dans l'intérêt de la Santé publique ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur mais aussi les règles de l'Honneur, de la Probité et du Désintéressement.

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine.

De ne dévoiler à personne les secrets qui m'auraient été confiés ou dont j'aurais eu connaissance dans l'exercice de ma Profession.

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser les actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois méprisé de mes Confrères si je manque à mes engagements.



LOUVEL Emeric

Dopage : nouveaux médicaments influant sur la biogénèse mitochondriale et musculaire.

Th. D. Pharm., Rouen, 2019, 122 p.

RESUME

Au cours de ces dernières années les connaissances sur les mécanismes moléculaires nécessaires à la fonction du muscle squelettique n'ont cessé de croître. Une multitude de composés susceptibles de conduire à des médicaments affectant la fonction des muscles squelettiques et, plus spécifiquement, la biogénèse mitochondriale ont fait l'objet d'investigations (pré)cliniques pour soigner des maladies neuromusculaires. Ces substances incluent des molécules agissant comme agonistes et des molécules agissant comme antagonistes. Dans la première sous-catégorie, on retrouve un agoniste de la protéine kinase activée par l'adénosine monophosphate (l'AICAR), des agonistes REV-ERB (par exemple GSK4112, SR9009, SR9011, SR10067, GSK2945), des composés activant les sirtuines (par exemple SRT1720, SRT2104), des précurseurs du nicotinamide adénine dinucléotide (par exemple le nicotinamide riboside), des agonistes AdipoR1 (par exemple ADP355, AdipoRon), des agonistes du récepteur activé par les proliférateurs de peroxysomes δ (par exemple GW501516, GW0742, L165041, KD3010), des agonistes des récepteurs liés aux œstrogènes (par exemple GSK4716, GSK9089). Dans les molécules antagonistes on retrouve les inhibiteurs de l'histone acétyltransférase GCN5 (par exemple MB-3, CPTH2), un inhibiteur du cycle folate-méthionine (MOTS-c), des inhibiteurs des voies de signalisation de la myostatine (par exemple Stamulumab, PINTA-745, REGN-2477, Ramatercept, BMS-986089, Bimagrumab). Le co-répresseur des récepteurs nucléaires 1 (NCoR-1) a été identifié comme une cible potentielle viable dans l'amélioration de la fonction musculaire mais aucun inhibiteur de cette protéine n'a encore été rapporté à ce jour. Certains de ces composés ont déjà fait l'objet d'utilisations abusives par des sportifs dans le but d'améliorer leurs performances. La nécessité de mettre en place des mesures antidopage préventives et proactives semble indispensable à la lutte contre ces nouvelles substances. Cependant le nombre limité d'informations sur leur métabolisme et leur élimination complique fortement les analyses antidopage.

MOTS CLES : Dopage – Mitochondries – Muscles striés squelettiques – Sport

JURY :

Président : Pr Jean Pierre GOULLÉ, Professeur émérite

Membres : Pr Michel GUERBET, Professeur

Pr Philippe VÉRITÉ, Professeur

Dr Valérie HARENG, Docteur en Pharmacie

DATE DE SOUTENANCE : 12 juin 2019