

## Mécanismes moléculaires impliqués dans l'activité myogénique de la triiodothyronine (T3)

Sophie Marchal  
Isabelle Cassar-Malek  
Anne Rodier  
Chantal Wrutniak  
Gérard Cabello

Depuis les travaux initiaux de Scow en 1951, de nombreuses données obtenues *in vivo* ont établi l'influence des hormones thyroïdiennes sur le développement musculaire. Les travaux réalisés au cours des trois dernières années grâce à la caractérisation des récepteurs nucléaires de la T3 ont permis d'élucider quelques mécanismes moléculaires impliqués dans la stimulation de la différenciation musculaire par cette hormone. Parallèlement à une activation de la synthèse des facteurs myogéniques MyoD et Myogénine observée dans les myoblastes murins (mais pas dans les myoblastes aviaires), l'inhibition de l'activité AP-1 semble constituer un mécanisme majeur de l'influence myogénique de la T3. Cette voie d'action implique, à un moment précis de la progression des myoblastes dans la voie de la différenciation terminale, l'induction de la synthèse de RXR et une stimulation transitoire de la voie de l'AMPc.

### ADRESSE

I. Cassar-Malek, S. Marchal: étudiantes en stage post-doctoral. A. Rodier: étudiante en thèse. C. Wrutniak: chargée de recherche à l'Inra. G. Cabello: directeur de recherche à l'Inra. Inra-Ensa, Laboratoire de différenciation cellulaire et croissance, Unité d'endocrinologie cellulaire, 2, place Viala, 34060 Montpellier Cedex 1, France.

### TIRÉS À PART

G. Cabello.

L'importance des hormones thyroïdiennes dans la régulation du développement musculaire est actuellement bien établie. Il a été initialement montré qu'elles exercent un contrôle positif sur la croissance pondérale du muscle squelettique [1]. Cette action s'explique non seulement par un accroissement du diamètre des fibres musculaires, mais également par une augmentation de leur nombre [2, 3]. Pour la plupart des espèces à développement précoce (grands mammifères, oiseaux, etc.), ce nombre n'évolue plus significativement après la naissance. Cela suggérerait donc que les

hormones thyroïdiennes exercent une influence anténatale sur ce paramètre, en accord avec leur importance dans la régulation du développement des mammifères et des amphibiens [4-7].

Parallèlement à leur action trophique, ces hormones influencent également la nature des isoformes de myosine synthétisées par le tissu musculaire. Au cours du développement, elles sont en particulier impliquées dans le contrôle de la transition myosine néonatale/myosine adulte [8, 9]. De plus, dans le muscle cardiaque, la T3 stimule directement l'expression du gène de la chaîne lourde de myosine

## RÉFÉRENCES

1. Scow RO. Effect of growth hormone on muscle and skin collagen in neonatal thyroidectomized rats. *Endocrinology* 1951; 49 : 641-6.
2. Sugie H, Verity MA. Postnatal histochemical fiber type differentiation in normal and hypothyroid rat soleus muscle. *Muscle Nerve* 1985; 8 : 654-60.
3. King DM. Thyroidal influence on nuclear accumulation and DNA replication in skeletal muscles of young chickens. *J Expert Zool* 1987; suppl 1 : 291-8.
4. Legrand J. Thyroid hormone effects on growth and development. In: Hennemann I, ed. *Thyroid hormone metabolism*. New York: Marcel Dekker Inc., 1986 : 503-34.
5. Cabello G, Wrutniak C. Fonction thyroïdienne fœtale et néonatale chez le ruminant; importance physiologique. In: Jarriège R, ed. *Physiologie et pathologie néonatale chez les animaux de ferme*. Paris: Inra, 1984 : 255-74.
6. Yaoita Y, Brown DD. A correlation of thyroid hormone receptor gene expression with amphibian metamorphosis. *Genes Dev* 1990; 4 : 1917-24.
7. Wang Z, Brown DD. Thyroid hormone-induced gene expression program for amphibian tail resorption. *J Biol Chem* 1993; 268 : 16270-8.
8. Whalen RG, Sell SM, Butler-Browne GS, Schwartz K, Bouveret P, Pinset-Haestrom I. Three myosin heavy chain isozymes appear sequentially in rat muscle development. *Nature* 1981; 292 : 805-9.
9. Butler-Browne GS, Herlicoviez D, Whalen RG. Effects of hypothyroidism on myosin isozymes transition in developing rat muscle. *FEBS Lett* 1984; 166 : 71-5.
10. Gustafson TA, Markham BE, Bahl JJ, Morkin E. Thyroid hormone regulates expression of a transfected  $\alpha$ -myosin heavy chain fusion gene in fetal heart cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84 : 3122-6.

rapide (MHC $\alpha$ ) et réprime celle du gène de la chaîne lourde de myosine lente (MHC $\beta$ ) [10, 11]. Bien qu'un tel effet direct n'ait pas été mis en évidence dans le muscle squelettique, cette hormone influence la synthèse des diverses isoformes de MHC d'une manière qui dépend du muscle étudié [12]. Il est également établi que les hormones thyroïdiennes augmentent la proportion de fibres rapides dans le muscle squelettique [13]. Chez le Rat, le récepteur c-erbA  $\beta$  est préférentiellement synthétisé dans les muscles lents, alors que c-erbA  $\alpha$ 1 constitue l'isoforme majoritaire dans les muscles rapides [14]. Ainsi, bien que la spécificité fonctionnelle de ces récepteurs soit très mal connue, la possibilité d'un contrôle indirect de la synthèse des myosines rapide ou lente par l'une des isoformes de c-erbA ne peut être écartée. En outre, dans cette espèce, la dénervation musculaire est associée à une forte diminution de l'expression du gène c-erbA  $\alpha$ 1 [14], ce qui suggère l'existence d'une interaction complexe entre les influences respectives de l'innervation et de la T3 sur l'acquisition des caractéristiques contractiles des fibres musculaires.

Enfin, la T3 est considérée comme un régulateur majeur de la mitochondriogenèse [15] et de l'activité mitochondriale [16, 17]. A ce titre, on peut raisonnablement penser qu'elle est impliquée dans le contrôle de l'acquisition des caractéristiques métaboliques des fibres musculaires. En effet, ce phénomène est associé à l'apparition d'une différence importante du nombre de mitochondries entre les divers types de fibres. Un récepteur mitochondrial de la T3, forme tronquée du récepteur nucléaire de cette hormone, c-erbA  $\alpha$ 1, a été récemment caractérisé. Il apporte un outil moléculaire qui doit aider à mieux comprendre l'influence de la T3 sur la différenciation métabolique des fibres musculaires. En effet, sa surexpression par transfection stable stimule la mitochondriogenèse et l'activité générale de l'organite [16, 18]. La T3 est donc une hormone importante pour la mise en place du tissu musculaire, puisqu'elle influence non seulement le déve-

loppement pondéral de ce tissu, mais également l'acquisition des caractéristiques contractiles et métaboliques des fibres musculaires. La compréhension des mécanismes impliqués dans les effets de cette hormone devrait donc permettre de mieux connaître les facteurs importants qui interviennent dans l'ontogenèse des masses musculaires.

## Quelques données générales sur la régulation de la myogenèse

Un certain nombre de travaux récents ont utilisé les cultures cellulaires pour étudier les mécanismes impliqués dans la régulation de la différenciation des myoblastes par la T3. En effet, les cultures de myoblastes, utilisées depuis de nombreuses années, permettent de reproduire les grandes étapes de la myogenèse en l'absence d'innervation. Les événements impliqués, résumés dans la *figure 1*, comprennent, notamment, le blocage des myoblastes en phase G1 du cycle cellulaire, étape indispensable à l'induction de la différenciation terminale de ces cellules. Dans les lignées myogéniques, la différenciation terminale est induite par une forte diminution de la concentration sérique du milieu de culture à subconfluence cellulaire. Cela permet d'étudier les événements qui surviennent au cours de la phase proliférative des myoblastes sans interférence notable avec les processus de différenciation terminale. En outre, les lignées, aisément transfectables, sont bien adaptées à l'étude des mécanismes moléculaires.

Le contrôle de la myogenèse fait intervenir un ensemble complexe de mécanismes répresseurs qui conservent les cellules dans le compartiment prolifératif, et de mécanismes inducteurs qui déclenchent la sortie des myoblastes du cycle cellulaire et la différenciation terminale. Parmi les mécanismes répresseurs, on a mis en évidence l'influence de certains facteurs de croissance tels que le FGF (*fibroblast growth factor*) [19] et des produits des oncogènes cellulaires comme Jun, Ras ou Fos [20, 21].

## RÉFÉRENCES

11. Green NK, Franklin JA, Ahlquist JAO, Gammage MD, Sheppard MC. Differential regulation by thyroid hormones of myosin Heavy Chain  $\alpha$  and  $\beta$  mRNAs in the rat ventricular myocardium. *J Endocrinol* 1989; 122: 193-200.
12. Izumo S, Nadal-Ginard B, Mahdavi V. All members of the MHC multigene family respond to thyroid hormone in highly tissue-specific manner. *Science* 1986; 231: 597-600.
13. Ianuzzo D, Patel P, Chen V, O'Brien P, Williams C. Thyroidal trophic influence on skeletal muscle myosin. *Nature* 1977; 270: 74-6.
14. Hoffman RK, Lazar MA, Rubinstein MA, Kelly AM. Differential expression of  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  and  $\beta 1$  thyroid hormone receptor genes in developing rat skeletal muscle. *J Cell Biochem* 1994; 18D (suppl): 517.
15. Brown GC. Control of respiration and ATP synthesis in mammalian mitochondria and cells. *Biochem J* 1992; 284: 1-13.
16. Wrutniak C, Cabello G. La voie d'action mitochondriale directe de la T3. Mythe ou réalité ? *médecine/sciences* 1996; 12: 475-84.
17. Sterling K, Brenner MA, Sakurada T. Rapid effect of triiodothyronin on the mitochondrial pathway in rat liver *in vivo*. *Science* 1980; 210: 340-3.
18. Wrutniak C, Cassar-Malek I, Marchal S, Rasclé A, Heusser S, Keller JM, Fléchon J, Dauça M, Samarut J, Ghysdael J, Cabello G. A 43-kDa Protein related to c-erbA  $\alpha 1$  is located in the mitochondrial matrix of rat liver. *J Biol Chem* 1995; 270: 16347-54.
19. Spizz H, Romar D, Strauss A, Olson N. Serum and fibroblast growth factor inhibit myogenic differentiation through a mechanism dependent of protein synthesis and independent of cell proliferation. *J Biol Chem* 1986; 261: 9483-8.
20. Bengal E, Ransone L, Scharfmann R, Dwarki VJ, Tapscott S, Weintraub H, Verma IM. Functional antagonism between c-Jun and MyoD proteins: a direct physical association. *Cell* 1992; 68: 507-19.

La découverte des facteurs myogéniques (Myf 5, MyoD, Myogénine, MRF4), facteurs de transcription qui jouent un rôle essentiel dans l'acquisition du phénotype musculaire et l'induction de la différenciation terminale *in vivo* comme *in vitro* (*m/s n° 4, vol. 10, p. 481*) [22-27] a constitué un apport majeur pour la compréhension des mécanismes qui règlent positivement la myogénèse. L'activité de ces facteurs est notamment conditionnée par leurs possibilités d'hétérodimérisation; les hétérodimères formés avec les produits du gène *E2-5*, MyoD/E12 ou MyoD/E47, ont une grande affinité pour les boîtes E (éléments de réponse aux facteurs

myogéniques présents sur le promoteur de leurs gènes cibles) et par conséquent une forte activité transcriptionnelle [28]. En revanche, les protéines Id, dépourvues de domaine de liaison à l'ADN, dont la synthèse est réprimée au cours des processus de différenciation, inhibent fortement l'activité des facteurs myogéniques, soit en complexant les produits du gène *E2-5*, soit en titrant directement MyoD dans un hétérodimère transcriptionnellement inactif [29]. Par ailleurs, on a démontré l'influence myogénique de MEF-2 (*myocyte enhancer factor 2*). Ce facteur, induit par MyoD et la Myogénine dans les cellules 10T1/2 [30], stimule

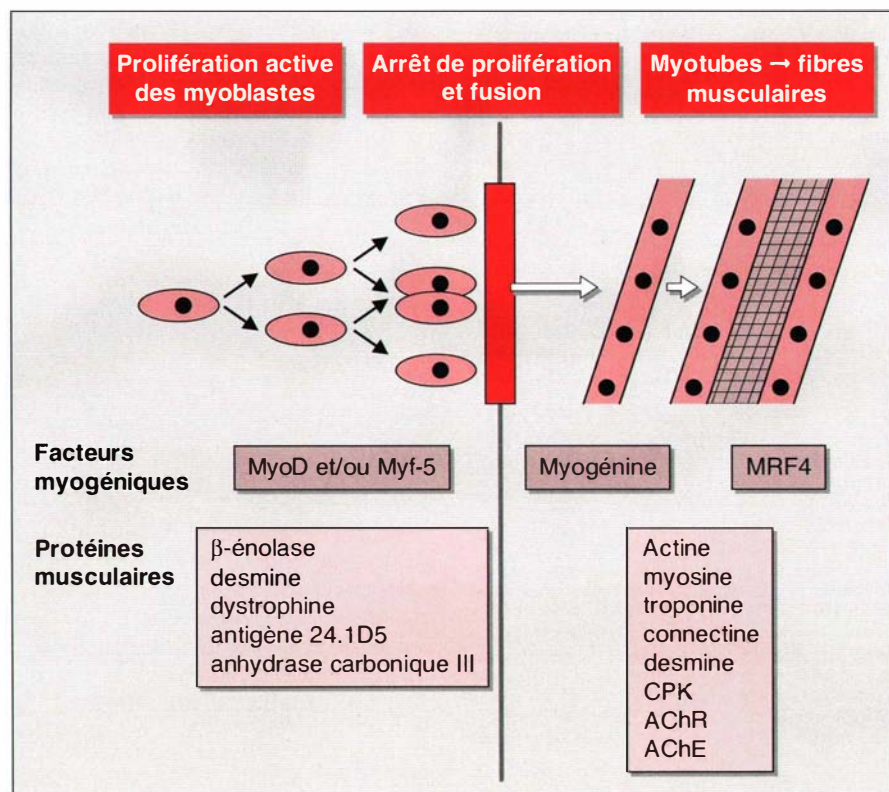


Figure 1. **Schéma récapitulatif des principaux événements de la différenciation des myoblastes *in vitro*.** Dans les lignées musculaires, la différenciation terminale est induite, à subconfluence, par un abaissement de la concentration en sérum du milieu de culture. Dans les cultures primaires ou secondaires de myoblastes aviaires, la différenciation terminale survient spontanément. L'évolution de la différenciation peut être estimée sur des critères morphologiques (indice de fusion: pourcentage de noyaux inclus dans les myotubes par rapport au nombre total de noyaux) ou biochimiques (quantification de la synthèse des protéines spécifiques du muscle). La sortie des myoblastes du cycle cellulaire est un préalable indispensable à la différenciation terminale des myoblastes. CPK: créatine phosphokinase; AChR: récepteur de l'acétylcholine; AChE: acétylcholine estérase.

## RÉFÉRENCES

21. Lassar AB, Thayer MJ, Overell RW, Weintraub H. Transformation by activated ras or Fos prevents myogenesis by inhibiting expression of MyoD. *Cell* 1989; 58: 659-67.
22. Rudniki MA, Schnegelsberg PNJ, Stead RH, Braun T, Arnold HH, Jaenisch R. MyoD or Myf-5 is required for the formation of skeletal muscle. *Cell* 1993; 75: 1351-9.
23. Hasty P, Bradley A, Morris JH, Edmondson DG, Venuti JM, Olson EN, Klein WH. Muscle deficiency and neonatal death in mice with a targeted mutation in the myogenin gene. *Nature* 1993; 364: 501-6.
24. Nabeshima Y, Hanaoka K, Hayasaka M, Esumi E, Shawoei L, Nonaka L, Nonaka I, Nabeshima YI. Myogenin gene disruption results in perinatal lethality because of severe muscle defect. *Nature* 1993; 364: 532-5.
25. Braun T, Arnold HH. Inactivation of Myf-6 and Myf-5 genes in mice leads to alterations in skeletal muscle development. *EMBO J* 1995; 14: 1176-86.
26. Zhang W, Behringer RR, Olson EN. Inactivation of myogenic bHLH gene MRF4 results in up-regulation of myogenin and rib anomalies. *Genes Dev* 1995; 9: 1388-99.
27. Alonso S. Des facteurs de régulation spécifiques de la myogenèse. *médecine/sciences* 1990; 6: 635-44.
28. Murre C, McCaw P, Vaessin H, Caudy M, Cabrera C, Buskin J, Hauschka S, Lassar A, Weintraub H, Baltimore D. Interactions between heterologous helix-loop-helix proteins generate complexes that bind specifically to a common DNA sequence. *Cell* 1989; 58: 537-44.
29. Benezra R, Davis RL, Lockshon D, Turner DL, Weintraub H. The protein Id: a negative regulator of helix-loop-helix DNA binding proteins. *Cell* 1990; 61: 49-59.
- l'expression de gènes spécifiques du muscle, dont celui codant pour la Myogénine [31]. Les interactions sont complexes entre les mécanismes répresseurs et inducteurs de la différenciation. Ainsi, certains facteurs de croissance inhibent la synthèse et l'activité des facteurs myogéniques [32]. Les oncogènes cellulaires peuvent également interférer avec l'activité de ces derniers. Par exemple, c-Jun forme un complexe avec MyoD et inactive ce dernier [20]. Des interactions fonctionnelles existent, en outre, entre les protéines de régulation du cycle cellulaire et MyoD. Ainsi, on a décrit la formation d'un complexe Rb/MyoD qui maintiendrait Rb sous une forme hypophosphorylée [33]. De même, la synthèse de la p21, qui est corrélée à l'induction de l'arrêt du cycle cellulaire dans les myoblastes C2 [34], pourrait être déclenchée par MyoD [35]. Réciproquement, la surproduction de la cycline D1 ou des inhibiteurs des Cdk (*cyclin dependent kinases*) p21 et p16 respectivement inhibent ou stimulent l'activité transcriptionnelle de MyoD [34]. Ces données suggèrent donc que ce facteur myogénique serait directement impliqué dans la sortie des myoblastes du compartiment prolifératif. Compte tenu de leur caractère récent, les études concernant l'influence myogénique *in vitro* de la T3 ont abordé de manière partielle l'ensemble de ces régulations. L'influence de cette hormone sur les mécanismes répresseurs de la différenciation a été essentiellement abordée *via* son action sur l'activité transcriptionnelle du complexe AP-1 (Jun/Fos ou Jun/Jun). Il est en effet bien établi qu'une stimulation de l'activité AP-1 réprime la différenciation terminale des myoblastes [36, 37]. Parmi les mécanismes inducteurs de la différenciation, l'influence de cette hormone sur la synthèse des facteurs myogéniques a fait l'objet de différents travaux; de même, les interactions MEF-2/récepteur nucléaire de la T3 ont été abordées. La grande majorité des expérimentations a été réalisée sur des lignées de myoblastes murins (C2.7, C2.C12...) ou aviaires (lignée de myoblastes de caille QM7).

## La T3 accélère la sortie des myoblastes du cycle cellulaire et stimule leur différenciation

La première étape des travaux consacrés à l'étude de l'activité myogénique de la T3 a consisté à caractériser l'influence de cette hormone sur la différenciation des myoblastes. Lorsque le modèle aviaire est utilisé (cultures secondaires de myoblastes de caille ou lignée QM7), la T3 en faibles concentrations (0,6 nM), stimule fortement la différenciation terminale des myoblastes, estimée par des critères morphologiques (indice de fusion) ou biochimiques (synthèse des protéines spécifiques du muscle) [38, 39]. Des résultats comparables ont été obtenus, en utilisant des concentrations supérieures d'hormone, dans la lignée murine C2.7 [40].

De manière intéressante, dans le modèle aviaire, et contrairement au modèle murin [41], cette activité myogénique de la T3 s'accompagne systématiquement d'une inhibition de la prolifération des myoblastes dans un milieu riche en sérum [38, 39] qui s'explique essentiellement par une forte augmentation du nombre de myoblastes post-mitotiques [39]. Au moins dans le modèle aviaire (myoblastes embryonnaires et lignée), la T3 accélère donc la sortie des myoblastes du cycle cellulaire, préalable indispensable à leur différenciation terminale. De plus, l'effet myogénique majeur de l'hormone est enregistré lorsque le traitement par la T3 est restreint à la période de prolifération des myoblastes [39]. Cela permet de conclure que le contrôle de la sortie des myoblastes du cycle cellulaire par la T3 est un élément très important de l'influence myogénique de cette hormone.

Par ailleurs, lorsque l'expression des facteurs myogéniques MyoD et Myogénine et la différenciation terminale des myoblastes aviaires sont inhibées par un traitement à la 5-bromo-2-désoxy-uridine [42], la T3 stimule modérément, mais significativement, la prolifération de ces cellules [38]. Un tel résultat est en accord avec l'observation selon laquelle un oligonucléotide antisens dirigé contre le récepteur c-erbA $\alpha$ 1

inhibe la prolifération de précurseurs neuronaux aviaires [43]. Ces données suggèrent donc que l'influence positive de cette hormone sur le nombre de fibres musculaires pourrait s'expliquer à deux niveaux: (1) une augmentation du nombre des cellules précurseurs du tissu musculaire, à un stade précoce du développement; (2) une stimulation de leur capacité de fusionner à un stade plus tardif.

Une telle explication est concevable dans la mesure où les hormones thyroïdiennes sont fonctionnelles à des stades précoces du développement. En effet, chez le poulet, la T3 d'origine maternelle est présente dans le jaune d'œuf et peut donc être transférée à l'embryon [44]. D'autre part, l'expression du gène *c-erbA $\alpha$ 1* a été détectée au stade le plus précoce étudié (4 jours *in ovo*) [45].

(COUP-TF) a également été proposée [16].

L'implication du récepteur nucléaire *c-erbA $\alpha$ 1* de la T3, seule forme détectable par *Northern blot* dans les cultures de myoblastes murins C2.7 ou aviaires (QM7), a été établie dans cette dernière lignée par des expériences de transfections stables. En effet, la surexpression de ce récepteur potentialise fortement l'influence myogénique de la T3 [46-48]. Or, deux types d'activité transcriptionnelle ont été rapportés pour ce récepteur: (1) une activité directe en présence de T3 sur ses gènes cibles; (2) une activité indirecte *via* une inhibition de l'activité transcriptionnelle du complexe AP-1 [49, 50]. Ces deux aspects ont été simultanément étudiés dans les myoblastes.

Les travaux concernant l'activité transcriptionnelle directe de ce récepteur ont privilégié l'influence de la T3 sur la production des facteurs myogéniques MyoD et Myogénine. Ils ont, cependant, fourni des résultats divergents dans les différents modèles expérimentaux étudiés. Dans les lignées murines C2.7 [40] et C2.C12 [51, 52], la T3 active la synthèse de ces facteurs myogéniques, en accord avec la présence des éléments de réponse à *c-erbA $\alpha$ 1* sur le promoteur de ces gènes [51, 52]. En revanche, dans la lignée aviaire QM7, la T3 n'influence pas la synthèse de ces facteurs myogéniques [39, 47, 53], en accord avec l'absence d'identification de T3RE sur les promoteurs des gènes aviaires.

La comparaison des résultats obtenus dans les modèles murins et aviaires indique que la stimulation de la synthèse de MyoD et de la Myogénine par la T3 n'est probablement pas un élément essentiel de l'activité myogénique de cette hormone. En effet, ce mécanisme n'est pas fonctionnel dans le modèle aviaire sur lequel la T3 exerce pourtant son influence la plus marquée. En revanche, le contrôle général de l'activité des facteurs myogéniques, qui comprend celui de leur niveau de synthèse au moins chez la Souris, pourrait constituer une cible importante de la T3. L'existence d'un complexe protéique incluant MEF-2 et le récepteur de cette hormone,

## RÉFÉRENCES

30. Martin JF, Schwarz JJ, Olson EN. Myocyte Enhancer Factor (MEF 2C): a tissue-restricted member of the MEF-2 family of transcription factors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 5282-6.
31. Edmonson DG, Cheng TC, Cserjesi P, Chahraborty T, Olson EN. Analysis of the myogenin promoter reveals an indirect pathway for positive autoregulation mediated by the muscle specific-enhancer factor MEF-2. *Mol Cell Biol* 1992; 12: 3665-77.
32. Olson EN. Interplay between proliferation and differentiation within the myogenic lineage. *Dev Biol* 1992; 154: 261-72.
33. Gu W, Schneider JW, Condorelli G, Kaushal S, Mahdavi V, Nadal-Ginard B. Interactions of myogenic factors and the retinoblastoma protein mediates muscle cell commitment and differentiation. *Cell* 1993; 72: 309-24.
34. Skapek SX, Rhee J, Spicer DB, Lassar AB. Inhibition of myogenic differentiation in proliferating myoblasts by cyclin D1-dependent kinase. *Science* 1995; 267: 1022-7.
35. Halevy O, Novitch BG, Spicer DB, Skapek SX, Rhee J, Hannon GJ, Beach D, Lassar AB. Correlation of terminal cell cycle arrest of skeletal muscle with induction of p21 by MyoD. *Science* 1995; 267: 1018-21.
36. Li L, Chambard JC, Karin M, Olson EN. Fos and Jun repress transcriptional activation by myogenin and MyoD: the amino terminus of Jun can mediate repression. *Genes Dev* 1992; 6: 676-89.
37. Park K, Chung M, Kim SJ. Inhibition of myogenesis by okadaic acid, an inhibitor of protein phosphatases 1 and 2A, correlates with the induction of AP-1. *J Biol Chem* 1992; 267: 10810-5.

### **L'activité transcriptionnelle directe du récepteur de la T3 *c-erbA* $\alpha$ 1 est-elle impliquée dans l'influence myogénique de la T3 ?**

Trois récepteurs nucléaires de la T3, produits des gènes *c-erbA*,  $\alpha$  et  $\beta$ , ont été caractérisés. Les formes  $\beta$ 1 et  $\alpha$  sont synthétisées de manière ubiquitaire alors que *c-erbA $\beta$ 2* est essentiellement synthétisé dans l'hypophyse. Les récepteurs *c-erbA* sont des facteurs de transcription dépendants de T3, qui se fixent sous forme dimérique sur des éléments de réponse spécifiques (T3RE pour *T3 responsive elements*) situés en amont des gènes cibles de la T3. En absence de ligand, ils répriment généralement la transcription. En présence de T3, après changement de conformation, ils activent fortement la transcription. Cependant, sur certains T3RE, *c-erbA* activé par son ligand agit comme répresseur transcriptionnel. Les récepteurs de la T3 se lient notamment à l'ADN sous forme d'hétérodimères avec les récepteurs de l'acide rétinoïque, de la vitamine D3, PPAR et les récepteurs de l'acide 9-cis-rétinoïque (RXR) qui semblent constituer les partenaires majeurs. La formation d'hétérodimères avec un récepteur orphelin

## RÉFÉRENCES

38. Marchal S, Cassar-Malek I, Pons F, Wrutniak C, Cabello G. Triiodothyronine influences quail myoblast proliferation and differentiation. *Biol Cell* 1993; 78: 191-7.
39. Marchal S, Cassar-Malek I, Magaud JP, Rouault JP, Wrutniak C, Cabello G. Stimulation of avian myoblast differentiation by triiodothyronine: possible involvement of the cAMP pathway. *Exp Cell Res* 1995; 22: 1-10.
40. Carnac G, Albagli-Curiel O, Vandromme M, Pinset C, Montarras D, Laudet V, Bonnieu A. 3, 5, 3'-triiodothyronine positively regulates both MyoD1 gene transcription and terminal differentiation in C2 myoblasts. *Mol Endocrinol* 1992; 6: 1185-94.
41. Albagli-Curiel O, Carnac G, Vandromme M, Vincent S, Crépieux P, Bonnieu A. Serum-induced inhibition of myogenesis is differentially relieved by retinoic acid and triiodothyronine in C2 murine muscle cells. *Differentiation* 1993; 52: 201-10.
42. Tapscott SJ, Lassar BA, Davis LR, Weintraub H. 5-Bromo-2'-deoxyuridine blocks myogenesis by extinguishing expression of MyoD1. *Science* 1989; 245: 532-6.
43. Lezoualc'h F, Seugnet I, Monnier AL, Ghysdael J, Behr JP, Demeneix BA. Inhibition of neurogenic precursor proliferation by antisense  $\alpha$  thyroid hormone receptor oligonucleotides. *J Biol Chem* 1995; 270: 12100-8.
44. Prati M, Calvo R, Morreale de Escobar G. L-thyroxine and 3, 5, 3'-triiodothyronine concentrations in the chicken eggs and in the embryo before and after the onset of thyroid function. *Endocrinology* 1992; 130: 2651-9.
45. Forrest D, Sjöberg M, Vennstrom B. Contrasting developmental and tissue-specific expression of  $\alpha$  and  $\beta$  thyroid hormone receptor genes. *EMBO J* 1990; 9: 1519-28.

nécessaire à l'induction du gène de la MHC $\alpha$  par la T3 ou par ce facteur de transcription, a été rapportée [54]; par extension, un tel résultat suggérerait que c-erbA pourrait également influencer l'activité des facteurs myogéniques par une interaction protéine/protéine directe. Les résultats actuels du laboratoire, pourtant en faveur de l'existence d'une telle interaction, ne démontrent pas de stimulation directe de l'activité de MyoD par c-erbA $\alpha$  dans les myoblastes aviaires.

Cependant, l'implication de l'activité transcriptionnelle de ce récepteur dans l'influence myogénique de la T3 ne peut être écartée. En effet, l'utilisation de la spécificité d'action de l'oncoprotéine v-erbA dans les myoblastes aviaires suggère qu'une telle voie participe à la stimulation de la différenciation terminale par cette hormone [47]. Des gènes cibles de la T3, différents de MyoD et myogénine, restent à caractériser.

### **L'activité myogénique du récepteur orphelin COUP-TF diverge dans les myoblastes murins et aviaires**

En raison de leur forte présence dans les myoblastes, on a étudié l'influence sur la myogenèse des récepteurs orphelins COUP-TF (*Chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor*) et rev-erbA $\alpha$  (transcrit à partir du brin non codant du locus c-erbA $\alpha$ ). Ces deux facteurs de transcription, qui appartiennent à la super famille des récepteurs nucléaires, présentent la particularité de se fixer sur des éléments de réponse dont la séquence nucléotidique est comparable à celle des T3RE. COUP-TF réprime l'activité transcriptionnelle des récepteurs de la vitamine D3, de la T3 et de l'acide rétinoïque [55] selon deux mécanismes. D'une part, sous forme d'homodimère, COUP-TF entre en compétition avec ces récepteurs pour l'occupation de leurs éléments de réponse respectifs; d'autre part, il pourrait s'hétérodimeriser avec certains d'entre eux pour former des complexes transcriptionnellement inactifs [56].

Sur les myoblastes murins C2.C12 cultivés dans un milieu non déplété en T3, Muscat *et al.* [57] montrent que COUP-TF réduit la fixation de l'homodimère c-erbA ou de l'hétérodimère c-erbA/RXR sur les T3RE des gènes MyoD et myogénine et inhibe fortement la synthèse de ces facteurs myogéniques. Cependant, la synthèse de l' $\alpha$ -actine squelettique, utilisée comme marqueur de différenciation, est beaucoup moins altérée. La même équipe montre que, selon des mécanismes du même type, la surexpression de rev-erbA $\alpha$  inhibe la différenciation terminale des myoblastes C2.C12 [58].

Paradoxalement, la surexpression de COUP-TF dans les myoblastes aviaires induit une forte stimulation de la différenciation de ces cellules, sans modifier significativement la synthèse de MyoD et Myogénine [47]. Plusieurs raisons peuvent expliquer une telle divergence selon l'espèce considérée. En premier lieu, les gènes MyoD et myogénine aviaires ne comportent pas de T3RE dans leur promoteur, contrairement aux gènes murins; cela exclut, *a priori*, un effet antagoniste de COUP-TF sur leur expression via un mécanisme dépendant de la T3. En second lieu, selon la classification de Forman et Samuels [59], COUP-TF pourrait se lier à des séquences nucléotidiques du même type que celles reconnues par l'oncoprotéine v-erbA. Or, l'expression de v-erbA stimule fortement la différenciation des myoblastes aviaires [46, 47]. Ainsi, en l'absence de mécanismes capables de réprimer la synthèse des facteurs myogéniques MyoD et Myogénine, COUP-TF pourrait modifier l'expression de gènes susceptibles de stimuler la myogenèse, également réglée par v-erbA. Aucune étude n'a été effectuée à notre connaissance pour déterminer l'influence myogénique de rev-erbA $\alpha$  dans les myoblastes aviaires. Cependant, comme ceux de COUP-TF, les mécanismes mis en cause dans la lignée C2.C12 [58] ne sont pas fonctionnels dans ces cellules ce qui permet d'envisager que rev-erbA $\alpha$  exerce une action différente dans les myoblastes murins et aviaires.

## RÉFÉRENCES

46. Cassar-Malek I, Marchal S, Altabel M, Wrutniak C, Samarut J, Cabello G. V-erb A stimulates quail myoblast differentiation in a T3-independent, cell-specific manner. *Oncogene* 1994; 9: 2197-206.
47. Cassar-Malek I. Influence de la forme oncogénique v-erb A du récepteur nucléaire de la T3 c-erbA  $\alpha 1$  sur la différenciation des myoblastes de caille. Mécanismes d'action. Thèse d'Université, Montpellier II, 1994: 155 p.
48. Cassar-Malek I, Marchal S, Rochard P, Casas F, Wrutniak C, Samarut J, Cabello G. Induction of c-erbA/AP-1 interactions and c-erbA transcriptional activity in myoblasts by RXR. Consequences for muscle differentiation. *J Biol Chem* 1996; 271: 11392-9.
49. Desbois C, Aubert D, Legrand C, Pain B, Samarut J. A novel mechanism of action for v-erb A: abrogation of the inactivation of the transcription factor AP-1 by retinoic and thyroid hormone receptors. *Cell* 1991; 67: 731-40.
50. Zhang XK, Wills KN, Husmann N, Hermann T, Pfahl M. Novel pathway for thyroid hormone receptor action through interaction with jun and fos oncogene activities. *Mol Cell Biol* 1991; 11: 6016-25.
51. Downes M, Griggs R, Atkins A, Olson EN, Muscat GEO. Identification of a thyroid hormone responsive element in the mouse myogenin gene: characterization of the thyroid hormone and retinoid X receptor heterodimeric binding site. *Cell Growth Differ* 1993; 4: 901-9.
52. Muscat GEO, Mynett-Johnson L, Dowhan D, Downes M, Griggs R. Activation of MyoD gene transcription by 3, 5, 3'-triiodo-L-thyronine: a direct role for the thyroid hormone and retinoid X receptors. *Nucleic Acids Res* 1994; 22: 583-91.
53. Rodier A. Régulation de l'expression de BTG1 dans les myoblastes aviaires. Implication dans l'effet myogénique de la T3 et de l'AMPC. Diplôme d'Études Approfondies, Université de Montpellier I, 1995: 20 p.

### En présence de RXR, le récepteur nucléaire de la T3, c-erbA $\alpha 1$ , inhibe l'activité AP-1 dans les myoblastes

Comme nous l'avons précédemment rapporté, l'activité transcriptionnelle du complexe AP-1 est un élément important de la régulation de la myogenèse. En particulier, la stimulation de cette activité induit une forte inhibition de la différenciation des myoblastes [36, 37]. L'étude des interactions fonctionnelles c-erbA/AP-1 présentait donc un intérêt particulier dans le cadre de la compréhension des effets myogéniques de la T3.

Des travaux antérieurs, notamment réalisés par l'équipe de J. Samarut à Lyon [49], ont établi que, comme les récepteurs de l'acide rétinoïque et des glucocorticoïdes, les récepteurs de la T3 activés par leur ligand inhibent l'activité AP-1. Les expériences réalisées dans le modèle aviaire (cultures secondaires et lignée QM7) démontrent cependant que les interactions c-erbA $\alpha 1$ /AP-1 ne sont pas fonctionnelles dans les myoblastes proli-

fératifs [46-48]. En accord avec les travaux réalisés par Downes *et al.* sur la lignée murine C2.C12 [60], aucune isoforme de RXR n'est décelable dans ces cellules [47, 48]. De plus, la synthèse de RXR $\gamma$  ou  $\alpha$  restaure la capacité de c-erbA $\alpha 1$  d'inhiber l'activité AP-1 dans les myoblastes aviaires [47, 48]. Cela démontre donc que RXR est un partenaire indispensable au caractère fonctionnel des interactions c-erbA/AP-1.

Or, les isoformes  $\gamma$  et  $\alpha$  de RXR sont induites très rapidement dans les myoblastes par la réduction de la concentration sérique du milieu de culture destinée à induire la différenciation terminale [60]. La T3, *via* son récepteur nucléaire c-erbA $\alpha 1$ , pourrait donc contribuer à déclencher la différenciation des myoblastes en inhibant l'activité AP-1 à un stade précis, caractérisé par la synthèse de RXR (figure 2). Cette hypothèse est en accord avec l'observation selon laquelle la surexpression de RXR $\gamma$  par transfection stable induit une forte potentialisation de l'effet myogénique de la T3 dans des myoblastes témoins ou surexprimant c-erbA $\alpha 1$  [48].

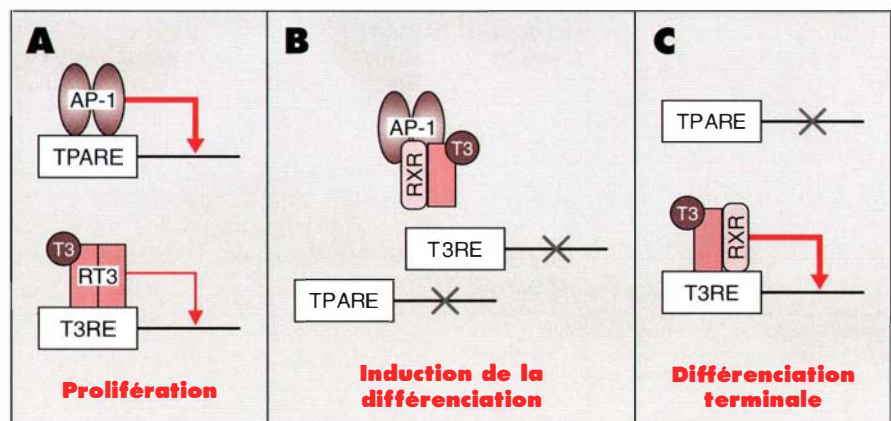


Figure 2. Hypothèse impliquant AP-1 et RXR dans l'influence myogénique de la T3. **A**. Dans les myoblastes prolifératifs, en absence de RXR, l'activité AP-1 est élevée ce qui réprime la différenciation. La T3 peut activer, pendant cette période, un ensemble de gènes importants pour la différenciation. **B**. L'expression de RXR induit la formation d'un complexe AP-1/c-erbA/RXR, à la fois inactif sur un T3RE (T3 responsive element) et sur un TPARE (TPA (tetradecanoyl phorbol acetate) responsive element). L'activité AP-1 est inhibée, déreprimant ainsi la différenciation terminale. Dans ces conditions, les protéines contrôlées par la T3, synthétisées en A, peuvent participer à l'induction de la différenciation. **C**. Dans les cellules différenciées, l'activité AP-1 est faible. Les gènes régés par la T3 sont activés par l'hétérodimère c-erbA/RXR. RT3 : récepteur de la T3; RXR : récepteur de l'acide 9-cis-rétinoïque.

Un tel mécanisme est particulièrement intéressant. Il pourrait en effet constituer une protection contre l'induction d'une différenciation anticipée par la T3 qui se traduirait par une réduction de la période de prolifération des myoblastes et, par conséquent, par un déficit en fibres musculaires à la naissance.

### **La stimulation de la différenciation des myoblastes par la T3 a une composante dépendante de l'AMPC**

Un autre mécanisme, de nature indirecte, a également été associé à l'influence myogénique de la T3. Une augmentation transitoire de la quantité d'AMPC intracellulaire quelques heures avant le début de la fusion des myoblastes a été rapportée au cours des années 1970 [61]. Or, il apparaît, au moins dans le modèle aviaire, que la T3 anticipe et potentialise cette élévation [39]. Cette observation prend toute sa valeur lorsque, dans ce même modèle, il est établi que l'inhibition de l'augmentation transitoire de l'AMPC bloque la différenciation terminale des myoblastes [39], ce qui établit l'implication d'un tel événement dans les processus qui induisent la différenciation. De plus, un traitement par le 8-Br-AMPC restreint à la phase proliférative des myoblastes reproduit l'ensemble des effets myogéniques de la T3: accélération de la sortie des myoblastes du cycle cellulaire, augmentation de l'accumulation nucléaire de BTG1 (pour *B-cell translocation gene*, voir paragraphe suivant), stimulation de la différenciation terminale [39]. Ces résultats suggèrent donc que l'activité myogénique de la T3 a également une composante dépendante de l'AMPC. Cependant, dans cette série d'expériences, aucune influence à court terme de la T3 sur la production d'AMPC comparable à celle rapportée antérieurement dans divers types cellulaires [62] n'a pu être mise en évidence. Cela démontre le caractère indirect d'une telle voie d'action.

Les mécanismes qui interviennent dans la stimulation de la différenciation

des myoblastes par l'AMPC sont multiples. Ainsi, l'influence de l'AMPC sur le caractère fonctionnel de la p27<sup>kip1</sup> [63], inhibiteur des complexes cdk-cyclines, a été récemment établie. Ce phénomène, qui pourrait être impliqué dans la sortie des myoblastes du cycle cellulaire, mériterait d'être vérifié dans les lignées myogéniques. Par ailleurs, la translocation nucléaire de MyoD, qui conditionne son activité, est sous contrôle indirect de la protéine kinase dépendante de l'AMPC (PKA) [64]. Enfin, l'influence myogénique du 8-Br-AMPC a été associée à deux autres mécanismes. D'une part, comme dans d'autres types cellulaires [65], la phosphorylation de c-erbA $\alpha$ 1 par la PKA potentialise son activité transcriptionnelle en présence de T3 [66] dans les myoblastes aviaires. Ainsi, en stimulant l'expression des gènes cibles de cette hormone, une telle voie d'action pourrait contribuer de manière indirecte à la stimulation de la différenciation musculaire par la T3. D'autre part, dans le même modèle, un traitement par le 8-Br-AMPC en phase proliférative augmente la synthèse du facteur de transcription CREB dépendant de l'AMPC dès l'induction de la différenciation [66]. En dehors de son activité transcriptionnelle directe, CREB inhibe l'activité AP-1, dans les myoblastes (*m/s n° 4, vol. 7, p. 506*) [66], comme dans les autres types cellulaires [67, 68].

Cependant, l'influence de CREB sur l'activité AP-1 est abolie par une phosphorylation par la PKA [66]. Cette constatation pourrait suggérer que l'activation de la voie AMPc, stimulus qui augmente la synthèse de CREB, devrait également inhiber par phosphorylation son éventuelle activité myogénique *via* la répression de AP-1. En fait, le caractère transitoire de l'augmentation de l'AMPC (2 h) associé à l'activation importante des phosphatases au cours de la différenciation [69, 70], se traduit probablement par l'existence d'une forme majoritaire non phosphorylée de CREB quelques heures après cet événement. Ces données permettent de proposer l'hypothèse présentée dans la *figure 3*, impliquant la voie AMPc dans la stimulation de la différenciation

## RÉFÉRENCES

54. Lee Y, Nadal-Ginard B, Mahdavi V. Myocyte-specific enhancer-binding factor 2 (MEF2) and thyroid hormone receptor (TR) associate and synergistically activate the  $\alpha$ -cardiac myosin heavy chain gene. *J Cell Biochem* 1994; 18D (suppl): 500.
55. Cooney AJ, Tsai SY, O'Malley BW, Tsai M. Chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor (COUP-TF) dimers bind to different GGTCA response elements, allowing COUP-TF to repress hormonal induction of the vitamin D3, thyroid hormone and retinoic acid receptors. *Mol Cell Biol* 1992; 12: 4153-63.
56. Cooney AJ, Leng X, Tsai SY, O'Malley BW, Tsai M. Multiple mechanisms of chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor-dependent repression of transactivation by the vitamin D, thyroid hormone and retinoic acid receptors. *J Biol Chem* 1993; 268: 4152-60.
57. Muscat GEO, Rea S, Downes M. Identification of a regulatory function for an orphan receptor in muscle: COUP-TFII affects the expression of the MyoD gene family during myogenesis. *Nucleic Acids Res* 1995; 23: 1311-8.
58. Downes M, Carozzi AJ, Muscat GEO. Constitutive expression of the orphan receptor, Rev-erb  $\alpha$ , inhibits muscle differentiation and abrogates the expression of the MyoD gene family. *Mol Endocrinol* 1995; 9: 1666-78.
59. Forman BM, Samuels HH. Dimerization among nuclear hormone receptors. *New Biol* 1990; 2: 587-94.
60. Downes M, Mynett-Johnson L, Muscat GEO. The retinoid acid and retinoid X receptors are differentially expressed during myoblast differentiation. *Endocrinology* 1994; 334: 2658-61.



## RÉFÉRENCES

61. Zalin RJ, Montague W. Changes in adenylate cyclase, cyclic AMP, and protein kinase levels in chick myoblasts, and their relationship to differentiation. *Cell* 1974; 2 : 103-8.
62. Segal G, Ingbar SH. 3, 5, 3'-triiodothyronine increases cellular adenosine 3', 5'-monophosphate concentration and sugar uptake in rat thymocytes by stimulating adenylate cyclase activity: studies with the adenylate cyclase inhibitor MDL 12330A. *Endocrinology* 1989; 124: 2166-71.
63. Darbon J, Fesquet D, Cavadore J. De nouveaux régulateurs du cycle cellulaire: les protéines modulatrices des complexes Cdk-cyclines. *médecine/sciences* 1995; 11: 349-56.
64. Vandromme M, Carnac G, Gautier-Rouvière C, Fesquet D, Lamb N, Fernandez A. Nuclear import of the nuclear myogenic factor MyoD requires cAMP-dependent protein kinase activity but not the direct phosphorylation of MyoD. *J Cell Sci* 1994; 107: 613-20.
65. Goldberg Y, Glineur C, Gesquiere JC, Ricouart A, Sap J, Vennström B, Ghysdael J. Activation of protein kinase C or cAMP-dependent protein kinase increases phosphorylation of the c-erbA-encoded thyroid hormone receptor and of the v-erbA-encoded protein. *EMBO J* 1988; 7: 2425-33.
66. Marchal S. Influence de la triiodothyronine (T3) sur la différenciation des myoblastes aviaires. Implication de la voie AMPc. Mécanismes d'action. *Thèse d'Université*, Montpellier I, 1995: 140 p.
67. Lamph WW, Dwarki VJ, Ofir R, Montminy MR, Verma IM. Negative and positive regulations by transcription factor cAMP response element-binding protein is modulated by phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 4320-4.

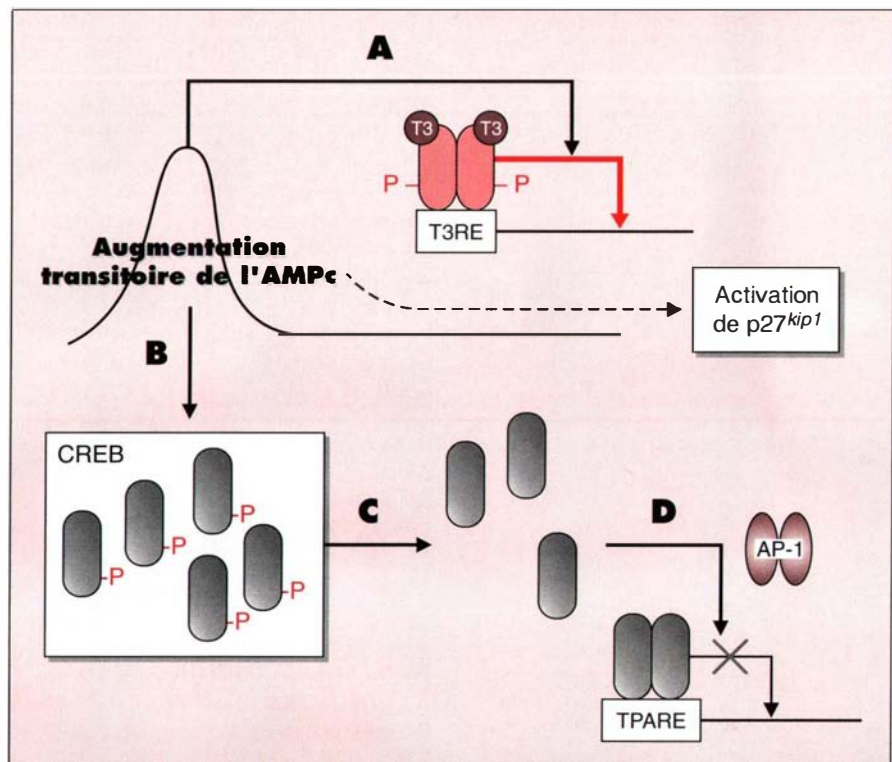


Figure 3. **Hypothèse impliquant l'élévation transitoire de l'AMPc dans la stimulation de la différenciation terminale des myoblastes aviaires par la T3.** Après potentialisation par la T3 de l'élévation transitoire de l'AMPc qui précède la différenciation des myoblastes. **A.** L'AMPc accroît l'activité transcriptionnelle du récepteur nucléaire de la T3, en activant sa phosphorylation par la PKA. Ce récepteur est impliqué dans la stimulation de la différenciation par la T3. Ce mécanisme est susceptible de potentialiser l'activité myogénique de cette hormone. **B.** L'AMPc stimule la synthèse du facteur de transcription CREB. **C.** Après la chute rapide de la concentration intracellulaire d'AMPc, la forme non phosphorylée de CREB devient majoritaire. **D.** CREB non phosphorylé inhibe l'activité AP-1, phénomène susceptible de déréprimer la différenciation terminale. Les points A, B et D sont démontrés expérimentalement. L'influence de l'AMPc sur l'activité de la p27<sup>kip1</sup>, mise en évidence dans un autre modèle, reste à établir dans les myoblastes. De plus, en activant la PKA, l'élévation de l'AMPc pourrait activer la translocation nucléaire de MyoD. T3RE: T3 responsive element; TPARE: TPA (tetradecanoyl phorbol acetate) responsive element.

tion des myoblastes par la T3. L'évolution respective des formes phosphorylées et non phosphorylées de CREB au cours de la différenciation reste néanmoins à établir pour conforter cette hypothèse. La réalité d'un tel mécanisme dans les cultures de myoblastes aviaires est en accord avec l'observation que la surexpression de CREB par transfection stable dans ces cellules stimule leur différenciation, et qu'un traitement continu par le 8-Br-AMPc annule l'influence myogénique de CREB [66]. Ce dernier résultat apporte également un élé-

ment d'explication aux travaux antérieurs indiquant qu'une stimulation prolongée de la voie AMPc (traitement par le 8-Br-AMPc ou le db-AMPc, surexpression de la sous-unité catalytique de la PKA), incluant la période de différenciation, inhibe cette dernière. Il faut souligner que ce type d'expérimentation n'est pas représentatif des phénomènes qui surviennent dans les cultures de myoblastes, caractérisés par une stimulation de très courte durée de la voie AMPc, qui survient avant la différenciation terminale. Il ne tient pas compte des

## RÉFÉRENCES

68. Hai T, Curran T. Cross-family dimerization of transcription factors Fos/Jun and ATF/CREB alters DNA binding specificity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 3720-4.
69. Ohishi S, Endo M, Kobayashi T, Terasawa T, Murakami T, Onoda M, Itoh T, Tsuiki S, Tamura S. Enhanced expression of type 2C protein phosphatase gene during myogenic differentiation of CH310T1/2 cells. *Biochem Int* 1992; 28: 345-51.
70. Srinivasan M, Begum N. Regulation of protein phosphatase 1 and 2A activities by insulin during myogenesis in rat skeletal muscle cells in culture. *J Biol Chem* 1994; 269: 12514-20.
71. Rimokh R, Rouault JP, Wahbi K, Gadoux M, Lafage M, Archimbaud E, Charrin C, Gentilhomme O, Germain D, Samarut J, Magaud JP. A chromosome 12 coding region is juxtaposed to the MYC protooncogene locus in a t(8; 12)(q24; q22) translocation in a case of B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Genes Chrom Cancer* 1991; 3: 24-36.
72. Rouault JP, Rimokh R, Tessa C, Paranhos G, Ffrench M, Duret L, Garroccio M, Germain D, Samarut J, Magaud JP. BTG1, a member of a new family of antiproliferative genes. *EMBO J* 1992; 11: 1663-70.
73. Segal G. Calcium is the first messenger for the action of thyroid hormone at the level of the plasma membrane: first evidence for an acute effect of thyroid hormone on calcium uptake in the heart. *Endocrinology* 1990; 126: 2693-702.
- travaux qui démontrent qu'une activation de cette voie est indispensable à l'induction de la différenciation mais n'est pas compatible avec son déroulement [39]. Ces données associées à celles présentées dans les paragraphes précédents suggèrent que l'activité AP-1 est une cible majeure de la T3 dans les myoblastes. Elle est, en effet, inhibée par deux mécanismes différents, dont le ciblage dans le temps est caractérisé par la synthèse de RXR d'une part, et l'existence d'une élévation de la quantité d'AMPc dont l'origine reste à définir, d'autre part. Il est intéressant de constater que ces deux événements, qui conditionnent l'aptitude de la T3 à inhiber l'activité AP-1, surviennent peu de temps avant le début de la fusion des myoblastes.

### **BTG1, protéine antiproliférative, est une cible de la T3 et de l'AMPc**

L'influence de la T3 sur la synthèse ou l'activité de protéines impliquées dans la régulation du cycle cellulaire n'a pas été étudiée dans les myoblastes. Cependant, en 1991, les travaux de Rimokh *et al.* [71] ont permis la caractérisation du gène *BTG1*, membre d'une nouvelle famille de gènes antiprolifératifs comprenant *Tis21* et *PC3*. Les caractéristiques de la synthèse de la protéine BTG1 au cours du cycle cellulaire permettent de penser qu'elle pourrait bloquer les cellules en phase G1, en accord avec son activité antiproliférative dans la lignée NIH3T3 [72].

Dans les myoblastes aviaires, la synthèse de BTG1, fortement réprimée au stade prolifératif, est induite à subconfluence cellulaire. A ce stade, la protéine est localisée dans le noyau. Bien que la T3 et le 8-Br-AMPc n'influencent pas l'état d'équilibre des transcrits *BTG1*, ces facteurs potentialisent fortement leur accumulation nucléaire [39] (figure 4) en stimulant leur translocation [53]. De plus, une stimulation de l'activité AP-1 inhibe fortement la synthèse de BTG1 endogène, en accord avec l'observation selon laquelle elle réprime l'activité du promoteur de son gène

[53]. Ces derniers résultats apportent un élément d'explication à l'absence d'expression de *BTG1* pendant la phase de prolifération, caractérisée par une activité AP-1 élevée. Enfin, la surexpression stable de *BTG1* dans les myoblastes aviaires accélère leur sortie du cycle cellulaire et stimule leur différenciation terminale [53].

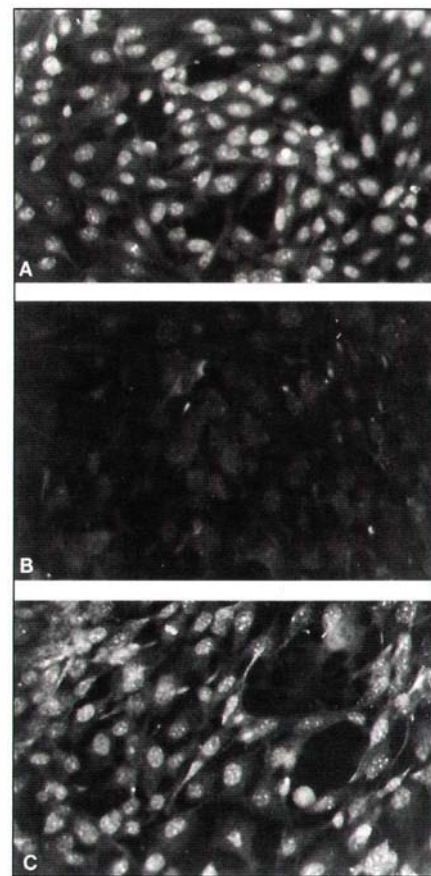


Figure 4. La T3 et le 8-Br-AMPc stimulent l'accumulation nucléaire de la protéine antiproliférative BTG1 (B-cell translocation gene). La localisation de la protéine BTG1 est étudiée à 72h de culture dans un milieu riche en sérum par cyto-immunofluorescence dans la lignée de myoblastes aviaires QM7 (anticorps obtenu par le Dr J.P. Rouault, Lyon, x 400). A. Myoblastes traités par la T3 (0,6 nM). B. Myoblastes témoins. C. Myoblastes traités par le 8-Br-AMPc (50  $\mu$ M). (document reproduit avec l'autorisation de Exp Cell Res).

L'hypothèse générale présentée dans la *figure 5*, concernant les mécanismes moléculaires de l'activité myogénique de la T3, peut être proposée à partir de l'ensemble des résultats passés en revue dans cette synthèse. L'inhibition de l'activité AP-1 joue un rôle important dans cette hypothèse. En effet, elle induit, notamment, la synthèse de BTG1, dont la translocation nucléaire est stimulée par la T3 et l'AMPc. De plus, l'inhibition de l'activité AP-1 se traduit par

une diminution de la synthèse de c-Jun, cible de ce complexe de transcription par un phénomène d'auto-régulation. Un tel phénomène peut permettre d'augmenter l'activité transcriptionnelle de MyoD par déséquestration de ce dernier du complexe Jun/MyoD.

## Conclusions

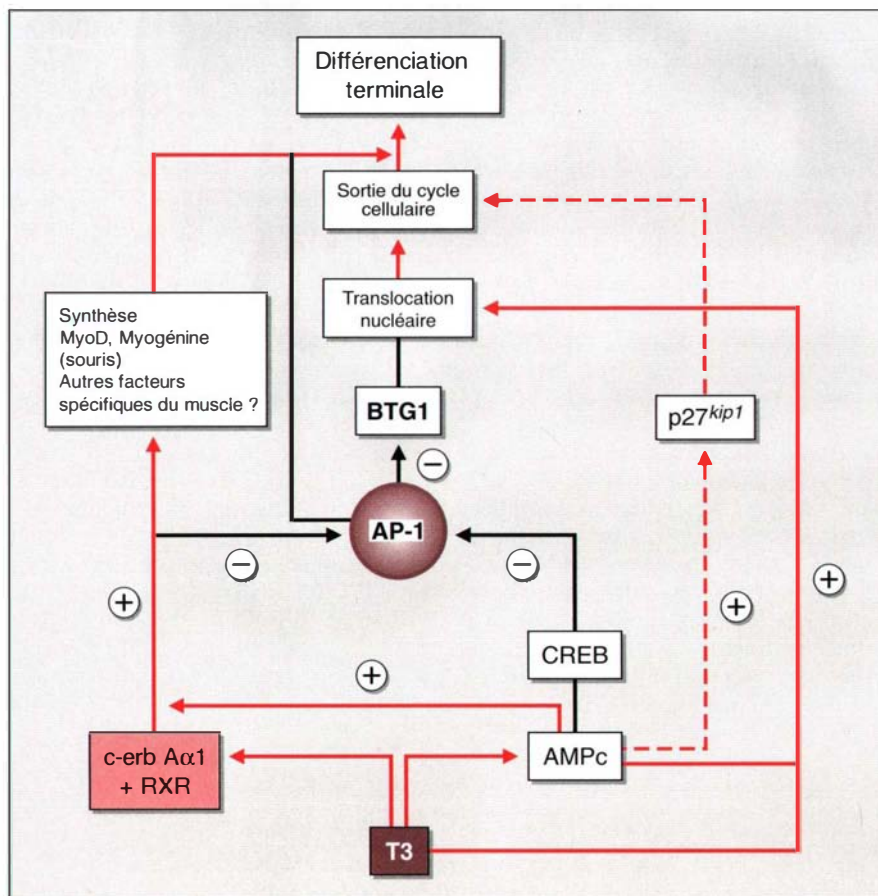
Bien que l'importance de la T3 dans la régulation des divers aspects

du développement musculaire soit établie depuis de nombreuses années, les mécanismes en cause n'étaient pas élucidés. Les travaux récents ont apporté des connaissances nouvelles dans ce domaine.

D'une part, l'activité myogénique de cette hormone est le résultat de plusieurs mécanismes convergents qui semblent impliquer le récepteur nucléaire de la T3, son partenaire RXR, et la voie de l'AMPc *via* le facteur de transcription CREB. D'autre part, il apparaît que l'inhibition de l'activité AP-1 constitue un mécanisme central de l'action de la T3 dans les myoblastes à un stade précis de leur progression vers la différenciation terminale, caractérisée par la synthèse de RXR et l'augmentation transitoire de la concentration intracellulaire d'AMPc. En outre, une inhibition de la synthèse de la PKC par la T3, dès l'induction de la différenciation terminale, a été observée au laboratoire [66]; elle pourrait constituer un mécanisme additionnel contribuant à la répression de l'activité AP-1.

Par ailleurs, il est intéressant de constater que, malgré la présence précoce de T3 et de ses récepteurs au cours du développement, ces mécanismes assurent une protection contre une différenciation anticipée des myoblastes par cette hormone. Ainsi, la T3 stimule indiscutablement la myogenèse, mais la présence de l'hormone et de ses récepteurs n'est pas suffisante pour induire une telle activité.

Enfin, l'hypothèse générale présentée *figure 5*, qui reprend l'ensemble des résultats concernant l'activité myogénique de la T3, constitue une première tentative intégrée de compréhension des mécanismes d'action de cette hormone au niveau moléculaire. Elle ne tient cependant pas totalement compte de la complexité des voies d'action de la T3. En effet, en modifiant les flux calciques [73], une éventuelle voie d'action membranaire pourrait être impliquée dans la régulation de la différenciation cellulaire. De plus, les travaux en cours dans notre laboratoire indiquent que la voie d'action mitochondriale de la T3 est un élément important de l'activité myogénique de cette hormone ■



**Figure 5. Bases moléculaires de l'activité myogénique de la T3 : hypothèse générale.** L'activité AP-1 inhibe la différenciation par plusieurs mécanismes. Elle réprime notamment la synthèse de la protéine antiproliférative BTG1 (B-cell translocation gene). L'inhibition de l'activité AP-1 par la T3, selon deux mécanismes impliquant l'AMPc et CREB d'une part, RXR d'autre part, déclenche la synthèse de BTG1. A ce stade, la T3 et l'AMPc stimulent la translocation nucléaire de BTG1. Ce mécanisme, à double détente, est susceptible d'induire la sortie des myoblastes du cycle cellulaire, élément très important de l'activité myogénique de la T3 et de l'AMPc. Par ailleurs, la potentialisation de l'élévation de l'AMPc qui précède la différenciation terminale des myoblastes stimule l'activité transcriptionnelle du récepteur de la T3. Enfin, ce phénomène pourrait induire l'activation de la p27<sup>kip1</sup>. Les phénomènes expérimentalement mis en évidence sont présentés en traits pleins. + : stimulation ; - : inhibition.

## Remerciements

Le travail réalisé par notre équipe qui figure dans cette synthèse a bénéficié d'un financement et de bourses d'études accordés par l'AFM et par l'ARC. Nous tenons également à remercier Jacques Samarut (ENS Lyon), Jean-Pierre Rouault, Jean-Pierre Magaud (Inserm Lyon) et Françoise Pons (Inserm Montpellier) pour leur collaboration à ce programme.

## Cours de Biologie Moléculaire de la Cellule

Enseignement pratique  
10 mars-13 avril 1997

Ce cours, conjointement organisé par l'Institut Pasteur et l'Institut Curie, se déroulera du 10 mars au 13 avril 1997 à plein temps, à l'Institut Pasteur à Paris. Il est destiné à des chercheurs du secteur public et privé, ayant une formation des facultés de sciences, de médecine, de pharmacie ou des écoles vétérinaires. Les candidats doivent avoir une bonne connaissance, niveau maîtrise, en biologie moléculaire. Les techniques de base de biologie moléculaire ne seront pas enseignées (exemple : clonage, séquençage de gènes, etc.). Ce cours donne lieu à un diplôme de l'Institut Pasteur suite à un examen qui se déroulera à la fin du mois d'avril.

Le thème central de ce cours concerne l'étude de la cellule eucaryote. Cet enseignement est très orienté vers l'initiation expérimentale, et fera une large place aux nouvelles techniques ainsi qu'à la démarche scientifique actuelle pour l'étude des fonctions cellulaires. Les travaux pratiques seront accompagnés de conférences théoriques sur les thèmes suivants :

- Organisation fonctionnelle de la cellule : compartiments membranaires, cytosquelette, polarité cellulaire
- Les routages intracellulaires : transport des protéines membranaires et sécrétées, endocytose des macromolécules
- Les contacts et la communication entre cellules
- La signalisation et la transduction des messages cellulaires
- Le cycle cellulaire

Les techniques mises en œuvre seront celles de l'analyse génétique, la transfection et l'expression de gènes clonés, la culture cellulaire, la reconstitution *in vitro* des fonctions cellulaires, la visualisation des constituants cellulaires y compris par les techniques les plus récentes de microscopie confocale et d'imagerie.

Avec la participation de : S. Amigorena, M. Arpin, M. Bornens, E. Chanat, P. Chardin, J. Cohen, P. Cossart, E. Coudrier, F. Dautry, A. Dautry-Varsat, S. Dufour, E. Fabre, E. Friederich, B. Goud, B. Hojlaek, C. Hopkins, D. Job, E. Karsenti, F. Képès, P. Legrain, D. Louvard, B. Maro, D. Montarras, S. Pelligrini, Ch. Puset, E. Schiebel, L. Sperling, J.-P. Thiéry et M. Weiss. Les cours théoriques seront assurés par des enseignants français et européens.

Responsables du cours : A. Dautry-Varsat et D. Louvard  
Renseignements et inscriptions, date limite le 1<sup>er</sup> décembre 1996  
Mme Banisso  
Secrétariat des Enseignements et des Stages  
Institut Pasteur, 28, rue du Dr Roux, 75724 Paris - Cedex 15, France.  
Tél. : 45.68.81.41 ou 40.61.33.62 - Fax : 40.61.30.46

## Summary

### Molecular basis of triiodothyronine myogenic influence

The importance of thyroid hormone in the regulation of *in vivo* myogenic processes is well documented. This hormone stimulates muscle growth by increasing the fibers number and diameter. In addition, T3 affects the expression of different myosin isoforms, by a direct transcriptional pathway in cardiac muscle, indirectly in skeletal muscle. Last, according to the strong effect of this hormone upon mitochondriogenesis and mitochondrial activity, it could be also involved in the processes of metabolic differentiation. However, the molecular basis of these influences remained largely unknown. Cell culture experiments provide strong evidence that T3 stimulates myoblast differentiation, by increasing the rate of myoblast withdrawal from the cell cycle. Recent data suggest that in murine myoblasts, *MyoD* and *myogenin* genes transcription is directly stimulated by T3; however, as a similar phenomenon does not occur in avian myoblasts in which T3 displays a stronger myogenic influence, such a mechanism is probably not essential. Studies performed in avian cells (secondary cultures and QM7 line) indicate that inhibition of AP-1 activity is probably a crucial target involved in the T3 myogenic influence.

Interestingly, this pathway is only effective at a specific stage of myoblast progression in the differentiation program: (1) the liganded c-erbA $\alpha$ 1 T3 nuclear receptor represses AP-1 transcriptional activity only when RXR is expressed, an event induced by reducing the serum concentration in the culture medium to induce terminal differentiation; (2) at this stage, a T3-regulated transient increase in cAMP production stimulates CREB expression, and consequently its ability to repress AP-1 activity. As AP-1 activity represses BTG1 (an antiproliferative protein) expression, this event consequently allows BTG1 to be synthesized. Moreover, T3 stimulates the nuclear import of this protein in parallel to an increase of myoblast exit from the cell cycle. Lastly, BTG1 overexpression, as a T3 treatment, stimulates myoblast terminal differentiation. All these data clearly suggest that AP-1 activity is a crucial target of T3, able to repress the expression of BTG1, a protein displaying a similar myogenic influence than T3. Moreover, as T3 and its receptor cannot inhibit AP-1 activity by themselves, this influence is only induced at a particular stage, thus providing protection against anticipated differentiation.

### International Association for the Study of Lung Cancer Atelier

## BASES BIOLOGIQUES DE LA PRÉVENTION DU CANCER BRONCHIQUE

Nancy, France, 20-22 octobre 1996

### Orateurs :

J. Battey, Rockville	S. Hanash, Ann Arbor	U. Pastorino, London
C. Bonaiti-Pellié, Paris	C. Harris, Bethesda	A. Pavirani, Strasbourg
N.E.C. Bradley, Montréal	F. Hirsch, Copenhagen	P. Rabbitts, Cambridge
V. Castronovo, Liège	M. Hogan, Houston	E. Rozengurt, London
F. Cuttitta, Bethesda	W.K. Hong, Houston	A. Sasco, Lyon
J. Field, Liverpool	D.R. Jacobson, New York	I. Schauer, Denver
H. Fujiki, Saitama	G.L. Johnson, Denver	J. Seidegard, Lund
A. Gazdar, Dallas	S. Lam, Vancouver	T. Soussi, Paris
R. Gemmill, Denver	A. Martínez, Bethesda	G. Sozzi, Milano
	J.-F. Mornex, Lyon	M. Tockman, Baltimore
	J. Mulshine, Bethesda	J.M. Vignaud, Nancy

Cet atelier est ouvert à tous

Le nombre de participants sera limité

Date limite de dépôt des résumés : 15 septembre 1996

Pour toute information, écrire ou téléphoner : Yves Martinet,

Service de Pneumologie, Hôpital de Brabois, 54511 Vandœuvre-lès-Nancy, France

Tél. : (33) 83.15.35.80 - Fax : (33) 83.15.35.41