

PROPOSITION de SUJET DE THESE
Année universitaire 2018

<p>1. LABORATOIRE</p> <p><i>Nom ou sigle : LIBM</i> <i>Statut : EA7424</i></p>	<p>2. DIRECTION DE THÈSE</p> <p><i>Directeur de thèse (HDR) : Laurent Messonnier(Pr, LIBM USMB)</i> <i>Codirecteurs : David Bendahan (DR CNRS, CRMBM, AMU) et Léonard Féasson (PU-PH, LIBM, UJM)</i></p>
<p>Laboratoire partenaire ou collaborations éventuels :</p> <p>David Bendahan (DR1) Aix-Marseille University, CNRS, CRMBM UMR 7339, Marseille, France Luc Pellerin (Pr) Department of Physiology, University of Lausanne, 1005 Lausanne, Switzerland</p>	<p>Domaine de compétences de l'ED SISEO :</p> <p>- Environnement <input type="checkbox"/> - Organisations <input type="checkbox"/> - Systèmes <input checked="" type="checkbox"/></p>
<p>3. SUJET DE THÈSE</p> <p>Titre : pH musculaire et ses mécanismes de régulation : Etudes fondamentales et appliquées à une physiopathologie (la drépanocytose).</p> <p>Title: Muscle pH and its regulatory mechanisms: fundamental and applied to a pathophysiology (the sickle cell disease) studies.</p>	

4. RESUME

(Français et Anglais)

Le premier volet (fondamental) des travaux de thèse (modèles murins) aura pour objectif, par l'utilisation d'inhibiteurs (ex : acetazolamide), de ligands (ex : bicarbonates) et de modèles murins génétiquement modifiés (ex : MCT1^{+/-}), d'investiguer par des études RMN le rôle spécifique de MCT1, MCT4, CAII et CAIII dans la régulation du pH musculaire lors de protocoles de repos-exercice-récupération.

Le second volet (appliqué) aura pour objectif l'étude du pH musculaire (par RMN) au repos, à l'exercice musculaire et lors de la récupération subséquente, ainsi que des mécanismes sous-jacents à la régulation du pH chez des patients drépanocytaires homozygotes (HbSS) en comparaison à une population de sujets contrôles (HbAA) et hétérozygotes à la maladie (HbAS). Les différences inter-sexes (due à l'HbF plus présente chez la femme, ce qui constitue un facteur protecteur contre la maladie) seront également investigués. Ce second volet inclura également des études ayant pour objectif l'analyse (par études RMN, biologiques/biochimiques et fonctionnelles du muscle) des effets de l'hydroxyurée (un des très rares traitement en vigueur pour la maladie) sur le pH musculaire, ses mécanismes de régulation et la fonction musculaire chez des souris transgéniques drépanocytaires (modèle Townes). Les effets de l'hydroxyurée combiné à un programme d'entraînement en endurance sur la réponse métabolique du muscle à l'exercice seront également investigués.

The first (fundamental) part of this work (on mice models) will aim, using inhibitors (e.g., acetazolamide), ligands (e.g., bicarbonates) and genetically modified mice models (e.g., MCT1^{+/-}) to investigate using NMR studies the specific role of MonoCarboxylate Transporter 1 (MCT1), MCT4, Carbonic Anhydrase II (CAII) and CAIII in muscle pH regulation during rest-exercise-recovery protocols.

The second (applied) part of this work will aim to study muscle pH (using NMR) at rest, during exercise and subsequent recovery, as well as the underlying mechanisms of pH regulation in patients with sickle cell anemia (HbSS) in comparison with controls (HbAA) and sickle cell trait carriers (HbAS). Because HbF level is higher in women, that provides a protective mechanism against the disease, the sex differences in muscle pH regulation and function will be also investigated. This second part will also aim to analyze (using RMN, biological/biochemical and functional studies) the effects of hydroxyurea (HU, one of the rare treatments for the disease) on muscle pH, its regulatory mechanisms and muscle function in sickle cell mice (Townes model). The combined effects of HU and endurance training will be also investigated.

5. PROJET DE RECHERCHE DETAILLE

(2 pages environ)

Introduction

Dans l'organisme, le pH est une variable régulée. Toute déviation de la valeur de base, entraîne une réponse physiologique afin de rétablir, ou tenter de rétablir, le pH initial. Au repos, le muscle strié squelettique a un pH d'environ 7,1 (7,0-7,2), mais à l'exercice intense, le métabolisme musculaire entraîne une telle production d'ions H^+ , que les mécanismes de régulation du pH peuvent se retrouver totalement dépassés. Dans cette configuration, le pH musculaire peut descendre jusqu'à des valeurs critiques de l'ordre de 6,4, où des réactions enzymatiques clefs sont inhibées et les mécanismes de la contraction musculaire perturbés.

Pour tenter de contrecarrer l'accumulation intracellulaire de protons, le muscle strié squelettique dispose de divers systèmes tampons impliquant : i) des protéines et les composés liés à l'histidine, ii) le phosphate libre, iii) les bicarbonates (HCO_3^-), leur transport dans la cellule via le co-transporteur sodium-bicarbonate (NBC) et les anhydrases carboniques (CAs : enzymes impliquées dans la réaction consommatrice de protons, dont plusieurs isoformes sont présentes dans la cellule musculaire et principalement CAII et CAIII), et iv) les mécanismes de transports du proton vers l'extérieur de la cellule principalement composés de l'échangeur sodium-proton (NHE1) et des co-transporteurs lactate-proton (MCTs) (Abe 2000, Juel et al. 2003, Juel 2008, Mannion et al. 1993, Parkhouse et al. 1984).

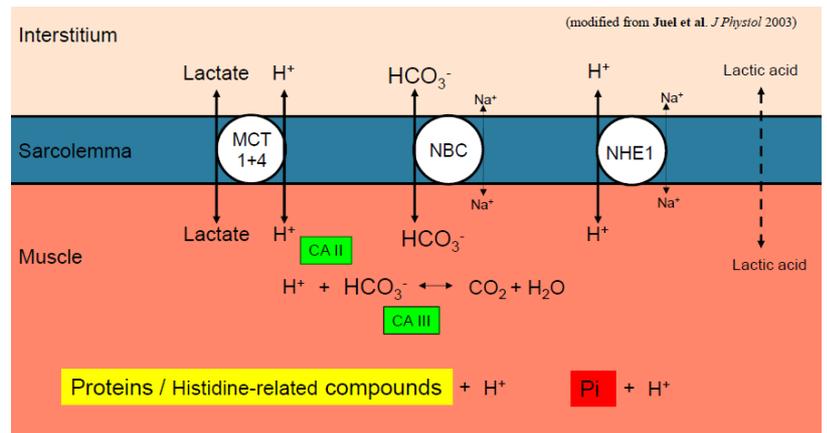


Figure 1 : Mécanismes de régulation du pH dans le muscle strié squelettique.

Etudes fondamentales des mécanismes de régulation du pH musculaire (modèles murins)

Au repos, il était considéré que le pH était principalement régulé par NHE1 et secondairement par les mécanismes liés aux bicarbonates. Les faibles concentrations de lactate au repos avaient conduit les chercheurs à disqualifier les MCTs qui ne joueraient qu'un rôle mineur voire nul au repos. Cependant, notre groupe a très récemment battu en brèche cette idée (Chatel et al. *FASEB J* 2017). En étudiant le métabolisme musculaire et en particulier le pH, par RMN, dans un modèle de souris $MCT1^{+/-}$, c-à-d déficiente en MCT1 à hauteur d'environ 50 % (100 % par un modèle $MCT^{-/-}$ aurait été léthal), nous avons montré que le pH musculaire était anormalement élevé au repos (7,2), suggérant un rôle majeur de MCT1 dans la régulation du pH au repos. Cependant, nous avons observé que la diminution génétique de MCT1 s'accompagnait d'une diminution phénotypique de CAII. Cette association n'est, au regard des travaux de l'équipe de Deitmer (Backer et al. 2005, 2008, 2011), pas si surprenante que cela puisque CAII et MCT1 sont intimement liés en terme de localisation et dans leur fonctionnement. Du coup, nos résultats ne nous permettent pas de conclure si c'est i) MCT1, ii) CAII, ou iii) les deux, la cause de l'élévation anormale du pH intramusculaire au repos. Le premier objectif des travaux de thèse (Objectif 1.a.) sera d'investiguer et d'approfondir le rôle spécifique de MCT1 et de CAII dans la régulation du pH musculaire lors de protocoles de repos-exercice-récupération (Chatel et al. *FASEB J* 2017). Pour conduire nos travaux, nous utiliserons des inhibiteurs (ex : acetazolamide), des ligands (ex : bicarbonates) et des modèles murins génétiquement modifiés (ex : $MCT1^{+/-}$). Le second objectif de ce premier volet d'études (Objectif 1.b.) sera, par les mêmes méthodes, de définir les rôles de MCT4 et de CAIII (Liu et al. 2007) dans la régulation du pH musculaire.

Etudes des mécanismes de régulation du pH dans une physiopathologie : la drépanocytose

La drépanocytose est une maladie génétique qui affecte la synthèse de l'hémoglobine (HbA) aboutissant à une hémoglobine anormale (HbS). Les conséquences de cette anomalie génétique sont principalement de deux ordres. D'abord, les globules rouges contenant de l'HbS sont fragiles et se rompent facilement. Non compensée par une

érythroïse pourtant augmentée, l'hémolyse entraîne une anémie (hémolytique) chronique sévère qui constitue la première manifestation clinique de la maladie. Ensuite, en condition désoxygénée, l'HbS polymérise, distordant les globules rouges (falciformation) qui se bloquent dans les microvaisseaux entraînant la seconde manifestation clinique majeure de la maladie : les crises vaso-occlusives, particulièrement douloureuses et potentiellement mortelles. Tous les organes sont potentiellement touchés par le défaut d'approvisionnement en oxygène et les infarctus. Nous avons ainsi montré que le muscle strié squelettique était affecté sur le plan structural, énergétique et microvasculaire ([Ravelojaona et al. Am J Pathol 2015](#)). La faible aptitude physique des patients drépanocytaires est en partie liée à un défaut d'approvisionnement en oxygène et une acidose musculaire est donc envisageable chez les patients, notamment à l'exercice, comme cela a été démontré dans le modèle murin de la drépanocytose par notre groupe ([Chatel et al. J Appl Physiol 2017](#)). Pourtant, à ce jour, aucune étude ne s'est penchée sur le pH musculaire et sa régulation à l'exercice chez les drépanocytaires. Le premier objectif de ce second volet (Objectif 2.a.) sera l'étude du pH musculaire (par RMN) au repos, à l'exercice musculaire et lors de la récupération subséquente, ainsi que des mécanismes sous-jacents à la régulation du pH (*vide supra*) chez des patients drépanocytaires homozygotes (HbSS) en comparaison à une population de sujets contrôles (HbAA) et hétérozygotes à la maladie (HbAS).

Les patientes drépanocytaires possèdent naturellement une petite quantité d'hémoglobine fœtale (HbF), supérieure à celle des patients. Il se trouve que cette hémoglobine fœtale limite les troubles hémorhéologiques liés à la maladie, augmente l'approvisionnement des tissus en oxygène et améliore le profil clinique des patients. Il est donc possible que les tissus et en particulier le muscle strié squelettique des patientes bénéficie de la plus forte présence d'HbF et souffre moins des conséquences de la pathologie que celui des hommes. Le moindre remodelage tissulaire, la moindre amyotrophie et les plus faibles répercussions de la pathologie sur le potentiel énergétique musculaire (les activités enzymatiques CS, HAD et COx sont moins touchées) que nous avons observés chez les patientes HbSS par comparaison à leurs homologues masculins tendent à confirmer cette hypothèse ([Ravelojaona 2014](#)). Pour les mêmes raisons, il est envisageable que le pH musculaire soit moins affecté chez les patientes et que les mécanismes de régulation du pH soient moins touchés par la pathologie que chez les hommes. Le second objectif de ces études (Objectif 2.b.) sera de compléter l'étude du pH musculaire à l'exercice par RMN par l'évaluation des mécanismes de régulation du pH musculaire (figure 1) dans une population de femmes HbSS, HbAS et HbAA et de comparer les résultats à leurs homologues masculins.

L'hydroxyurée (HU) constitue un des rares traitements dans la drépanocytose. Le principal effet et intérêt de cette molécule est d'induire la synthèse d'hémoglobine fœtale. Avec un taux d'HbF augmenté, le profil clinique des malades est très nettement amélioré (*vide supra*). Dans une étude récente ([Chatel et al. J Appl Physiol 2017](#)), nous avons mis en évidence sur un modèle murin le fait que le muscle de souris HbSS était soumis à une plus forte acidose lors de l'activité physique que des souris HbAA et HbAS, et que la cause en était vraisemblablement un défaut dans l'approvisionnement du muscle en oxygène. Parce que l'HbF améliore cet approvisionnement, nous testerons dans un modèle de souris transgénique drépanocytaires (model Townes) l'hypothèse selon laquelle (Objectif 2.c.) les souris traitées à l'HU montrent une moindre acidose et une meilleure fonction musculaire que les souris non traitées.

Par ailleurs, les résultats préliminaires obtenus chez l'homme ([Merlet et al. en cours](#)) tendent à montrer que les patients sous hydroxyurée bénéficient plus des effets de l'entraînement en endurance (améliorent plus leur performance et leurs caractéristiques musculaires) que les patients sans traitement. Encore une fois, le meilleur approvisionnement en oxygène sous HU permettrait une meilleure réponse musculaire à l'entraînement. Un second objectif de cette étude (Objectif 2.d.) sera de mettre en évidence les effets bénéfiques de l'HU sur le métabolisme énergétique musculaire à l'exercice en réponse à l'entraînement en endurance dans le modèle murin Townes de la drépanocytose.

6. CANDIDAT RECHERCHE :

Le/la candidat(e) recherché(e) devra faire preuve :

- de connaissances approfondies de son domaine d'étude
- de maîtriser ou rapidement acquérir les techniques nécessaires à l'avancée des travaux
- de qualités de réflexion
- d'autonomie
- de qualités rédactionnelles certaines
- d'adaptation à différents environnements (puisque les travaux impliquent plusieurs équipes)
- de sociabilité
- d'une certaine mobilité
- d'une volonté de communiquer, de partager

7. FINANCEMENT DE LA THESE : *Le contrat doctoral fixe une rémunération principale, indexée sur l'évolution des rémunérations de la fonction publique : depuis le 1er février 2017, elle s'élève à **1768,55 euros bruts mensuels** pour une activité de recherche seule. Des heures d'enseignements peuvent être effectuées dans la limite de 64 heures équivalent TD par année universitaire **après autorisation du président de l'université** et rémunérées au taux fixé pour les travaux dirigés en vigueur. D'autres activités complémentaires au contrat doctoral sont prévues par l'article 5 du décret n° 2009-464 du 23 avril 2009 modifié. La durée totale des activités complémentaires aux activités de recherche confiées au doctorant dans le cadre du contrat doctoral ne peut excéder un sixième du temps de travail annuel.*

8. CALENDRIER :

- 1/ Appel d'offre national : du 3 avril au 1 juin 2018
- 2/ Clôture de l'AO, détermination du candidat/de la candidate et envoi des dossiers : le 4 juin 2018
- 3/ Audition des candidats : lundi 18 ou mardi 19 juin 2018

9. CONTACT :

Prof. Laurent Messonnier
Tél : +33 (0)4 79 75 81 85
Email : laurent.messonier@univ-smb.fr

10. PROCEDURE DE CANDIDATURE AUPRES DU DIRECTEUR DE THESE:

Faire parvenir les éléments suivants au directeur de thèse AVANT LE 25 AVRIL 2018

- CV détaillé du candidat/de la candidate
- Notes, moyenne et classement parcours initial (Licence) + Master 1 + Master 2
- Lettre de motivation

Une prise de contact avec le directeur de thèse est très fortement recommandée