Université Fédérale
Toulouse Midi-Pyrénées

THÈSE

En vue de l'obtention du
DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE
Délivré par l'Université Toulouse 3 - Paul Sabatier

Présentée et soutenue par

MARIE CATENACCI

Le 23 mai 2023

Communication entre le tissu adipeux blanc et le muscle squelettique pendant la sarcopénie : le rôle de l'haptoglobine dans les altérations des processus de régénération

Ecole doctorale : **BSB - Biologie, Santé, Biotechnologies**

Spécialité : **PHARMACOLOGIE**

Unité de recherche :
RESTORE

Thèse dirigée par
Cedric DRAY

Jury

M. Stéphane WALRAND, Rapporteur
Mme Geneviève DERUMEAUX, Rapporteure
M. Yves ROLLAND, Examinateur
M. Cedric DRAY, Directeur de thèse
Mme Capucine TROLLET, Présidente

« Dans la vie, rien n’est à craindre, tout est à comprendre. » Marie Curie

●●●

REMERCIEMENTS

●●●

Je tiens tout d'abord à remercier les membres de mon jury de thèse : le Dr Capucine TROLLET, le Pr Geneviève DERUMEAUX, le Pr Yves ROLLAND et le Pr Stéphane WALRAND, qui m'ont fait l'honneur de me lire, d'évaluer mes travaux de thèse et de participer à ma soutenance.

Après 5 ans passés au sein d'Adipolab à l'I2MC puis de Métabolink à RESTORE, il est temps pour moi de partir vers de nouvelles aventures. Je tenais tout particulièrement à remercier, dans un premier temps, toute l'équipe **Adipolab** et **Métabolink** mais également toutes les personnes du **laboratoire RESTORE**.

Un grand merci à mon chef, **Cédric DRAY,** de m'avoir permis de réaliser cette thèse au sein de son équipe. Tu m'as accordé ta confiance sur ce financement ANR qui m'a permis de finaliser mes études et de réaliser tous ces travaux de thèse. Occupé par tes autres obligations telles que les enseignements et la direction de l'équipe, tu m'as fait confiance pour le développement et la réalisation de certains axes de recherche de ce projet. Tu m'as également permis de développer une autonomie et une indépendance au sein du laboratoire qui me sera très utile pour mon post-doctorat. Merci d'avoir essayé de me rassurer lors de la préparation pour l'école doctorale et pour la préparation à ma soutenance de thèse. Bien que cela n'est pas toujours été facile pour toi je te l'accorde, merci d'avoir composé avec mon manque de confiance en moi. Enfin, bien que ces 5 dernières années n'aient pas toujours été simples, elles ont été intenses autant sur le plan professionnel que scientifique. J'ai pu énormément apprendre à tes côtés.

Jean-Philippe, je tenais à te remercier pour l'entrainement lors de la préparation à la soutenance de thèse. Merci également pour tes précieux conseils et corrections lors de ma candidature pour mon post-doctorat.

Je tenais particulièrement à remercier le directeur de ce laboratoire RESTORE, **Philippe Valet**. Merci de m'avoir accueilli au sein de votre équipe à l'I2MC lors de mon stage de Master I. Merci pour la transmission de votre savoir, de votre passion pour la science, la recherche et pour l'enseignement. Avec **Isabelle Castan**, je vous remercie de m'avoir donné envie de poursuivre dans cette voie, de réaliser une thèse et d'enseigner.

Merci **Ophélie** et **Marie** pour les heures passées en sacrifice et pendant les différentes expériences. Merci d'avoir fait avancer mon projet d'une manière ou d'une autre.

Je remercie particulièrement les thésards et post-doc de mon équipe : le plus ancien **Enzo Piccolo** mais aussi **Chloé Brodeau**, **Rémi Montané**, **Gonçalo Pomba De Almeida**, **Garance Castino, Marion Stephan, Jean NAKHLE et Céline Saint-Laurent**. Un remerciement particulier à **Laurène Mazeyrie**, **Clémence Tropis** et **Eléna Morin**. Les filles, on a commencé cette aventure toutes les quatre, ensemble, à l'I2MC. Merci de m'avoir soutenue, épaulée, fait grandir et remise dans le droit chemin quand il fallait. Merci pour les délires, les repas et les fous rires. Vous êtes devenues, à mes yeux, des amies sur qui je peux compter. Ma thèse n'aurait pas été la même sans vous et je sais d'avance que vous allez me manquer lors de mon aventure de post-doc.

Enzo (#**Picc**), merci de m'avoir accueilli et pris sous ton aile au sein d'Adipolab au début de mon Master II. Tu m'as montré comment marché le laboratoire, les petites astuces et un certain nombre de protocoles avant ton grand départ pour Chicago. Tu as su me montrer, à ta manière, que je pouvais le faire. J'espère que l'on aura l'occasion de se revoir aux USA ou au Canada.

Elena (#**Momo**), merci pour ta douceur, ta gentillesse, les discussions sérieuses mais aussi pour les délires que l'on a pu avoir. Tu as su me communiquer ta passion et ton amour pour la science. Merci pour tout. Je n'ai pas de doute quant à ta réussite pour ta soutenance et le « après ».

Laurène (#**Mimi**), merci pour ta douceur, ton dévouement et ta gentillesse. Tu es formidable et l'une des personnes les plus sensibles et gentilles que je connaisse. Bonne chance pour cette 4^{ième} année de thèse. Tu mérites tout le bonheur ma petite Laurène.

Clémence (#**Troups**), je suis particulièrement touchée d'écrire ces quelques mots. On est arrivé ensemble, toutes les deux en Master II. Tu m'as soutenu pendant l'école doctorale et surtout tu m'as toujours apporté ton soutien pendant les différentes étapes de cette thèse. Ça n'a pas toujours été simple pendant ces quelques années mais je n'aurais pas vécu la même aventure sans toi. J'ai énormément appris à tes cotés grâce à tes conseils et ta force de caractère qui est impressionnante. Tu as toujours été de bons conseils. Merci pour tout Dr TROPIS. Good Luck pour ta soutenance, même si je n'ai aucun doute quant à ta réussite.

Garance (#**Gaga**), merci pour ta gentillesse et tes conseils qui m'ont été précieux. Merci d'avoir toujours pris le temps de m'écouter. Je te laisse le flambeau de l'équipe muscle-Dray ☺. N'hésite pas si besoin.

Merci aux anciens membres d'Adipolab ou de Metabolink : **Johanna Auriau**, **Bernard Masri**, **Nancy Geoffre** et **Lucas Bourdens**. Un GRAND merci à **Alizée Dortignac** (#**Dorti**) et **Vanessa Bouguetoch** (#**Boubou**). Merci de m'avoir accueillie et intégrée dans l'équipe, de m'avoir formée. Merci également pour le soutien dont vous avez fait preuve dans les différentes étapes. Au-delà d'être des collègues de travail, vous êtes devenues toutes les deux de vraies amies. N'oubliez pas de venir me rendre visite aux pays des Caribous.

Je tenais également à remercier tous les membres de la **RESTORE Family** et **tous les doctorants** de l'open space. Merci pour ces weekends de décompression, les moments passés dans l'Open Space et toute votre bonheur humeur au quotidien.

Mathilde & **Mathilde**, merci pour le soutien en fin de thèse et les repas pour décompresser. Merci de m'avoir écouté. Bonne chance pour la thèse Mathilde R.

Marie-Laure, merci pour ton dévouement et pour ton implication dans mon projet. Merci pour les précieux conseils que tu as su me donner, pour ton soutien dans ma recherche de post-doctorat, pour ton épaule et tes oreilles attentives lors de mes craquages en cytométrie. Trier ces cellules satellites n'aura pas été chose facile mais on aura bien rigolé et OUI on l'a fait. Un GRAND merci. N'oublie pas de passer me dire bonjour quand tu viendras au Canada.

Jessica, la deuxième cyto-girl de ce laboratoire, nos petits jeux lors de mes tris cellulaires vont me manquer à Ottawa ainsi que nos terribles séances de souffrances « intensives » sportives. Merci pour ta patience, tes blagues et tes délires. Et j'espère que tu t'épanouiras dans ta nouvelle vie.

A **toute ma famille**, je tenais à vous dire merci pour votre engouement, pour votre soutient. **Papa** et **Maman**, merci de m'avoir transmis des valeurs qui je suis sure me permette de m'épanouir et d'évoluer au sein de mon travail. Merci d'avoir cru en moi, de m'avoir apporté un soutien sans limite. Merci d'avoir accepté que je prenne mon envol dans une autre ville puis dans un autre pays. Sachez que ma force et ma persévérance je la tiens de vous et c'est une chose qui ne changera jamais.

A mon petit frère, **Romain**, je tenais à te dire à travers ces quelques lignes à quel point je suis fière de toi. Je suis fière de notre complicité et de notre amour pour les voyages. Visiter le monde avec toi est l'un des plus beaux cadeaux que tu me fais. Évolue, grandit, apprends mais ne change pas, tu es la prunelle de mes yeux comme ça.

Je tenais également à remercier du fond du cœur ma belle-famille qui m'a également énormément soutenue depuis plus de 5 ans :

Mes beaux-parents **Marie-France** & **Philippe.**

Ma belle-sœur **Julie**.

Mes neveux **Victor** & **Antoine**.

Je dédie un grand merci à mes plus proches amis qui ont vécu cette aventure de thèse par procuration.

Manon, après plus de 10 ans d'amitié, tu es toujours présente à me soutenir dans toutes les épreuves de ma vie. On a pu se voir évoluer et on continuera à le faire même à des milliers de km. Tu sais tout ce que je pense de toi, tu es comme une sœur et je te dis juste un grand MERCI.

Marco, **Kévin**, **Clémentine**, **Audrey**, **Pierre** et **Mathilde**, vous êtes mes acolytes, le groupe de potes dont tout le monde rêve, la famille que je me suis choisie. Nos discussions, nos délires, nos sorties, nos weekends vont me manquer. Tous, à votre manière, vous m'avez tellement apporté et fait grandir pendant cette expérience de doctorat que ce soit par nos discussions, nos délires mais aussi vos attentions et connexions. J'espère de tout cœur qu'on se refera des petits voyages et qui sait, peut-être, un au Canada.

Manue, je pense que je n'ai pas besoin de t'écrire des longues lignes pour que tu saches ce que je pense ou à quel point je suis fière de toi. On a commencé ensemble à la faculté de Biologie à Paul Sabatier et j'ai fini cette aventure à tes cotés. Merci en tout cas pour ton soutien indéfectible et ta patience, au quotidien, dont tu as fait preuve.

Guy, **Laurence**, **Françoise**, merci d'avoir été comme mes deuxièmes parents sur Toulouse ou Montauban et d'avoir été présents durant cette belle journée de soutenance de thèse.

Je finis ces remerciements par mon mari **Stéphane**. Je ne saurai jamais comment te dire merci de m'avoir soutenu tout au long de mes études. Je sais que

sans toi je ne serai pas la femme que je suis aujourd'hui, que je n'aurai pas eu le même parcours universitaire et pu autant m'épanouir dans mon travail. Tu m'as énormément soutenu, apporté et tu continues de la faire. Tu me fais progresser tous les jours depuis plus de 7 ans. Je serai toujours là pour toi, l'oublie pas ! J'ai hâte de commencer cette nouvelle aventure à tes côtés.

PS : je m'excuse d'avance si j'ai oublié des personnes.

●●●

RÉSUMÉ

●●●

La sarcopénie, caractérisée par une perte de force et de masse musculaire au cours du temps, est due à différentes causes pouvant affecter les fibres musculaires ou les cellules souches musculaires lors du processus de régénération. Aujourd'hui, il est nécessaire de trouver de nouvelles stratégies afin de ralentir la survenue de cette pathologie. Pour cela, notre hypothèse de travail est basée sur la communication inter-organe, et plus précisément, la communication entre le tissu adipeux et le muscle squelettique au cours du vieillissement. Avec l'âge, le tissu adipeux blanc voit ses sécrétions être modifiées tant quantitativement que qualitativement. Grâce à une étude protéomique réalisée sur du plasma et du tissu adipeux provenant de souris jeunes et âgées, nous avons observé une augmentation de trois protéines avec l'âge dont l'haptoglobine. Cette glycoprotéine possède différents rôles au sein de l'organisme dont celui de protéger le muscle squelettique du stress oxydatif. De plus, ses deux récepteurs (CD163 & CCR2) sont retrouvés sur les cellules inflammatoires, cellules importantes pour le processus de régénération. Dans ce contexte, mon doctorat a consisté à étudier le rôle de l'haptoglobine dans la communication entre le tissu adipeux et le muscle au cours de la sarcopénie et de la régénération musculaire associées au vieillissement. Dans un premier temps, nous avons pu observer qu'un traitement chronique (28 jours) à l'haptoglobine n'affectait pas la qualité de la fibre musculaire mature. D'un autre côté, grâce à un modèle murin de régénération musculaire induite par la cardiotoxine, nous avons pu montrer que l'haptoglobine chez des souris âgées de 3 mois et 12 mois, retardait les processus de régénération musculaire, notamment en diminuant les capacités de prolifération et de différenciation des cellules souches musculaires. Ainsi, nos résultats indiquent que l'haptoglobine, et plus largement le tissu adipeux blanc, pourraient être considérés comme une potentielle cible thérapeutique pour ralentir l'apparition et la progression de la sarcopénie liée à l'âge. En agissant sur le tissu adipeux *via* différentes stratégies (nutritionnelle ou pharmacologique), nous objectivons de réguler la surproduction de cytokines provenant du tissu adipeux au cours du vieillissement comme d'haptoglobine et par conséquence, de réduire l'incidence de la sarcopénie et les dépendances associées.

Mots clés : Vieillissement – Dépendance – Sarcopénie – Régénération – Haptoglobine

●●●

ABSTRACT

●●●

Sarcopenia is defined as an aged-associated progressive loss of muscle mass and strength over the time. This pathology is due to many causes that alter both muscle fibers and/or stem cells capacities during regenerative process. Regarding the trajectories of aging in developed countries, it will be a crucial medical need to find new strategies to slow down the onset of this pathology. To do so, our working hypothesis is based on inter-organ communication, and more specifically, on adipocyte-muscle crosstalk during aging. Indeed, age is assocatied with a deep qualitative and quantitative modification of adipose tissue secretions. Through proteomic study carried out on plasma and adipose tissue of young and old mice, we observed an increase of three proteins with age including haptoglobin. This glycoprotein possesses many roles in organism including skeletal muscle protection of oxidative stress. Moreover, inflammatory cells exhibit two haptoglobin's receptors (CCR2 and CD163), and these cells are crucial for regenerative process. In this context, the main objective of my PhD was to study the role of haptoglobin in the adipocyte-muscle crosstalk during age-associated sarcopenia and muscle regeneration. First, chronic haptoglobin treatment (28 days) did not affect the quality of mature muscle fibers. In another hand, using a cardiotoxin-induced muscle regeneration model, we demonstrated that haptoglobin, in 3 and 12-months-old mice, delays muscular regeneration process, in particular by reducing proliferative and differentiation capacities of muscle cells. Together, these results suggest that haptoglobin, and more broad white adipose tissue, could be considered as future therapeutic targets to slow down the onset and the process of age-related sarcopenia. By acting on adipose tissue thought different aspect (nutrition, pharmacology…) the ultimate aim will be to regulate the age -related overproduction of adipose tissue secretions such as haptoglobin and consequently reduced the incidence of sarcopenia and dependency.

Key words: Aging – Dependency – Sarcopenia – Regeneration – Haptoglobin

●●●

TABLE DES MATIÈRES

●●●

REMERCIEMENTS - 2 -

RÉSUMÉ - 8 -

ABSTRACT - 10 -

ABBRÉVIATIONS - 15 -

LISTES DES FIGURES ET TABLEAUX - 18 -

INTRODUCTION - 21 -

PARTIE I : LES MÉCANISMES IMPLIQUÉS DANS LE DÉVELOPPEMENT DE LA SARCOPÉNIE - 22 -

I. LA BALANCE PROTEIQUE : LA PROTEOSYNTHESE ET LA PROTEOLYSE PROTEIQUE - 24 -

1. Les mécanismes de la protéosynthèse - 25 -

a. Le ribosome : siège de la synthèse protéique - 25 -

b. Les protéines chaperonnes - 25 -

2. Les mécanismes responsables de la protéolyse - 26 -

a. Le système ubiquitine-protéasome (UPS) - 26 -

b. L'autophagie - 27 -

3. Les voies de signalisation régulant cette balance protéique - 28 -

a. Les voies majeures de la régulation de cette balance protéique : la voie PI3K/AKT - 28 -

b. Les voies majeures de la régulation de cette balance protéique : la voie AMPK - 31 -

c. Les autres voies impliquées dans la régulation de cette balance protéique : la voie NF-κB et la voie WNT - 32 -

4. Les dérégulations de ces voies et les conséquences associées sur la balance protéique au cours du vieillissement - 34 -

II. LE METABOLISME MITOCHONDRIAL - 37 -

1. Les mitochondries : organites clé du métabolisme - 37 -

2. Les altérations au sein des mitochondries liées au cours du vieillissement - 40 -

III. LA REGENERATION MUSCULAIRE - 41 -

1. La cellule responsable de la régénération : la cellule satellite - 42 -

2. Les différentes phases de la régénération - 48 -

a. La phase régénérative de la régénération musculaire - 48 -

b. La phase inflammatoire de la régénération musculaire - 52 -

c. Interactions entre les cellules myogéniques et les cellules immunitaires - 56 -

3. Les différentes voies impliquées dans les capacités régénératives du muscle squelettique - 60 -

a. La voie NOTCH : rôle majeur dans les premières étapes de la régénération - 60 -

b. La voie WNT : rôle crucial dans les étapes tardives de la régénération musculaire - 61 -

c. La voie p38-MAPK : actrice de différentes étapes de la régénération musculaire - 64 -

d. Le rôle des voies FAK et ERK5 dans la fusion musculaire : dernière étape de la phase régénérative - 65 -

e. Les autres voies impliquées dans le processus de régénération - 65 -

4. Les autres cellules impliquées dans les processus de régénération - 68 -

a. Les progéniteurs fibro-adipogéniques - 68 -

b. Les fibroblastes - 71 -

5. Les dérégulations du processus de régénération liées au vieillissement : - 77 -

a. Les pertes des capacités myogéniques au cours du vieillissement - 77 -

b. Le changement de micro-environnement au cours du vieillissement - 79 -
c. Les altérations des voies de signalisation nécessaires à la régénération musculaire - 79 -
d. Les changements des proportions des cellules immunitaires et de leurs fonctions. - 81 -
e. Les modifications liées à l'âge des autres cellules impliquées dans la régénération musculaire - 83 -
IV. LA FIBROSE - 84 -
PARTIE II : IDENTIFICATION DE NOUVELLES MOLÉCULES IMPLIQUÉES DANS LE DÉVELOPPEMENT DE LA SARCOPÉNIE - 88 -
I. LES FACTEURS CIRCULANTS PRINCIPAUX IDENTIFIES - 88 -
II. LES NOUVELLES STRATEGIES DEVELOPPEES : LE TISSU ADIPEUX BLANC, ORGANE CLE DANS LA SECRETION DE FACTEURS CIRCULANTS - 90 -
1. Les modifications du tissu adipeux blanc au cours du vieillissement - 90 -
2. Le tissu adipeux, organe clé dans le dialogue inter-organe avec le muscle squelettique : le rôle des adipokines au cours du vieillissement - 99 -
III. L'HAPTOGLOBINE, CIBLE POTENTIEL DE LA LUTTE CONTRE LA SARCOPENIE ? - 101 -
1. L'haptoglobine : définitions - 101 -
a. Le polymorphisme de l'haptoglobine - 101 -
b. Localisation de l'haptoglobine : les organes, cellules et fluides - 101 -
2. Régulations et rôles de l'haptoglobine - 102 -
a. L'haptoglobine : une protéine liée à l'inflammation - 102 -
b. L'haptoglobine : rôle dans la réponse antioxydante - 103 -
c. L'haptoglobine, protéine présente dans le cadre de l'obésité, quelle est son rôle ? - 104 -
d. Rôle de l'haptoglobine dans les cancers - 106 -
e. Le rôle de l'haptoglobine sur le muscle squelettique : rôle dans la prévention de la faiblesse musculaire - 106 -
f. L'haptoglobine, une protéine induite par le vieillissement, quelles en sont les conséquences ? - 107 -

HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS DE TRAVAIL - 110 -

MATÉRIELS ET MÉTHODES - 113 -

RÉSULTATS - 123 -

DISCUSSION - 149 -

BIBLIOGRAPHIES - 165 -

●●●

ABBRÉVIATIONS

●●●

EWGSOP	European Working Group on Sarcopenia in Older People
IRM	Imagerie par résonnance magnétique
DEXA	Dual Energy X-Ray Absorptiometry
BIA	BioImpedence Analysis
SPPB	Short Physical Performance Battery
UPS	Ubiquitin-proteasome system
Ub	Ubiquitine
MAFbx	Muscle Atrophy F-box
MuRF1	Muscle RING Finger 1
FoxO	Forkhead box
AMPK	AMP-activated protein kinase
CAMKKβ	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase bêta
AICAR	5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucléotide
PGC1α	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha
NRF	Nuclear respiratory factor
TFAM	Mitochondrial transcription factor A
Mfn	Mitofusin
OPA1	Optic atrophy type 1
PINK1	PTEN-induced putative kinase 1
ARNmt	ARN mitochondrial
TIMPs	Tissue Inhibitors of Metalloproteinases
FGF-2	Fibroblast growth factor 2
MMPs	Matrix Metalloproteinases
MRFs	Myogenic factor
Pax_7	Paired Box 7
HGF	Hepatocyte growth factor
TRPC	Transient Receptor Potential Cation Channels
NFATC	Nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic 1
PCNA	Proliferating Cell Nuclear Antigen
NTX	Neurotoxine
TNFα	Tumor Necrosis Factor alpha
IL	Interleukin
IFNγ	Interféron gamma

CCL2	Chemokine Ligand 2
MCP-1	Monocyte Chemoattractant Protein 1
NO	Monoxyde d'azote
TGFβ	Transforming Growth Factor bêta
CIITA	class II, major histocompatibility complex transactivator.
PCP	Planar Cell Polarity
Fzd	Frizzled
LIF	Leukemia inhibitory factor
TEM	Transition épithélio mésenchymateuse
NFκB	Nuclear Factor-kappa B
FAPs	Fibro/Adipogenic Progenitors
CTGF	Connective Tissue Growth Factor
PAI-2	Plasminogen Activator Inhibitor-2
GDF-8	Growth differentiation factor 8 (= Myostatine)
FSV	Fraction stroma vasculaire
OSM :	Oncostatin M
HFD	High Fat Diet
LHS	Lipase Hormono-sensible
PPAR-γ	Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma
CDX	Cardiotoxine
KWB	Kinetic Weight Bearing
WT	Wild Type
EDL	Extensor digitorum longus
SASP	Senescence-associated secretory phenotype
OPN	Osteopontin
IF	Intermittent Fasting (= jeûne intermittent)
NK	Natural Killer

●●●

LISTES DES FIGURES ET TABLEAUX

●●●

Introduction :

Figure 1 : Les différentes causes de la sarcopénie.
Figure 2 : Les différentes étapes de l'autophagie.
Figure 3 : Rôle de la voie AKT dans la protéosynthèse et la protéolyse.
Figure 4 : Rôle de la voie AMPK dans la protéosynthèse et la protéolyse.
Figure 5 : Dérégulations de la voie AKT au cours du vieillissement et conséquences associées.
Figure 6 : La division asymétrique et symétrique des cellules satellites.
Figure 7 : Expression des différents gènes de la myogenèse pendant l'étape de la phase régénérative.
Figure 8 : Les différentes étapes de la phase inflammatoire de la régénération musculaire et les communications existantes avec les cellules myogéniques.
Figure 9 : Les différentes voies cellulaires et leurs impacts sur les différentes étapes de la myogenèse, lors d'une régénération musculaire.
Figure 10 : Interaction entre les FAPs, les cellules immunitaires et les cellules myogéniques.
Figure 11 : Les myofibroblastes, les cellules responsables de la matrice extra-cellulaire transitoire.
Figure 12 : Dérégulations du processus de la matrice extra-cellulaire transitoire.
Figure 13 : Rôles *in vitro* et *in vivo* de l'haptoglobine sur le tissu adipeux blanc viscéral.
Figure 14 : Les différents rôle de l'haptoglobine au sein de l'organisme.

Résultats :

Figure 1 : L'haptoglobine n'impacte pas la fibre mature musculaire lors d'un traitement chronique de 28 jours.
Figure 2 : L'haptoglobine altère la fonction musculaire, de manière spécifique, lors d'une régénération musculaire dans le *gastrocnemius* chez la souris âgée de 3 mois.
Figure 3 : L'haptoglobine altère la myogenèse lors d'une régénération musculaire dans le *gastrocnemius*, chez la souris âgée de 3 mois.
Figure 4 : L'haptoglobine altère la myogenèse chez des cellules musculaires C2C12.
Figure 5 : Rôle de l'haptoglobine sur une culture primaire de cellules satellites.
Figure 6 : L'haptoglobine induit une modification de l'expression des gènes de l'inflammation, sans altérer la proportion des cellules inflammatoires lors d'une régénération musculaire dans le *gastrocnemius*, chez la souris âgée de 3 mois.

Figure 7 : L'haptoglobine semble altérer la myogenèse lors d'une régénération musculaire chez la souris âgée de 12 mois.
Figure 8 : L'haptoglobine semble induire une modification de l'expression des gènes de l'inflammation.

Discussion :

Figure 15 : Effets du jeûne intermittent sur la prise de poids, la glycémie, la cétonémie et l'haptoglobinémie chez des souris âgées de 15 et 24 mois.

Tableaux :

Tableau 1 : Tableau récapitulatif sur les facteurs circulants agissant sur le muscle squelettique, leurs variations au cours du vieillissement et les essais cliniques en cours reportés dans ClinicalTrials.gov database.

●●●

INTRODUCTION

●●●

PARTIE I : LES MÉCANISMES IMPLIQUÉS DANS LE DÉVELOPPEMENT DE LA SARCOPÉNIE

La sarcopénie, provenant du grec (*sarx* : la chair et *penia* : la perte), a été évoquée pour la première fois dans les années 1930. En 1989, elle est définie comme la perte involontaire et physiologique de masse musculaire survenant au cours de l'âge. Depuis, cette définition a évolué et il a fallu attendre 2010 pour qu'un consensus soit établi par l'EWGSOP (= European Working Group on Sarcopenia in Older People) sur sa définition, insistant sur la prise en compte de la notion de perte de **masse** mais également de la **force** musculaire[1]. Ainsi, en 2010, la sarcopénie est alors définie comme la **perte de la force et de la masse musculaire, associée à des baisses des performances physiques**. Ce n'est que récemment que la sarcopénie a été reconnue comme étant une pathologie par la classification internationale des maladies : le CIM-10. Cette pathologie entraine progressivement la perte d'autonomie et un risque accru de blessure.

Afin de mieux définir la sarcopénie, il est important de maitriser toutes les techniques d'évaluation permettant d'explorer la physiologie musculaire. Aujourd'hui, en clinique, il est possible de mesurer différents paramètres dont : i) la masse musculaire, ii) la force musculaire et iii) la performance physique.

Concernant la masse musculaire, chez l'homme, il existe plusieurs techniques dont trois sont basées sur l'imagerie : la tomodensitométrie qui consiste à reconstituer le volume d'un organe à partir d'une série de mesure, l'imagerie par résonnance magnétique (= IRM) basée sur la résonnance magnétique et la technique d'absorption bi-photonique à rayon X (= DEXA) qui permet de distinguer la masse maigre (= masse musculaire), la masse grasse et la masse osseuse. On peut également la mesurer en utilisant la bioimpédancemétrie[2] (= BIA) qui permet de mesurer la masse maigre et la masse grasse grâce aux propriétés différentes de conductivité des tissus. Cette liste des méthodes citées n'est pas exhaustive et il existe d'autres méthodes possiblement utilisées en recherche clinique (comme la mesure de potassium[3] ou la mesure de la 3-créatinine par exemple). Cependant aucune de ces dernières n'est utilisée en routine en clinique pour mesurer la masse musculaire totale d'un individu.

Bien que mesurer la force musculaire dans les membres inférieurs responsables de la locomotion est plus judicieux dans le cadre de la sarcopénie, certaines études mesurent la force des membres supérieurs par la technique du Grip Test[4]. L'utilisation

de ce test permet de mesurer une force isométrique de préhension dans la main grâce à un dynamomètre. Ce test est un bon indicateur qui peut être prédictif de la masse musculaire. Il existe également des tests qui permettent de mesurer la force musculaire dans les membres inférieurs tels que le test de flexion/extension du genou. Ce test mesure la force isométrique maximale volontaire dont la contraction n'entraine pas une modification de la taille des fibres musculaires. Cependant, il nécessite un certain matériel et son utilisation est donc limitée en clinique.

Enfin, pour mesurer les performances physiques, les cliniciens utilisent le score SPPB qui évalue 4 paramètres : i) l'équilibre, ii) la marche, iii) la force et iv) l'endurance. Afin de réaliser ce score, différents tests sont réalisés comme la mesure de la vitesse de marche et le test de « levée de chaise » qui peuvent être facilement utilisés en clinique pour diagnostiquer la sarcopénie. Cette pathologie se caractérise par un score SPPB inférieur ou égal à 8[5]. Comme cité ci-dessus, la vitesse de marche peut être également utilisée seule pour évaluer la sarcopénie. Selon l'EWGSOP, une vitesse de marche inférieure à 0,8m/sec est une prédiction de la sarcopénie[6].

L'utilisation de définitions et méthodes d'exploration différentes au cours du temps conduisent à des fluctuations de la prévalence de la sarcopénie[7]. Cependant, on estime que cette pathologie affecterait 10 à 16% des personnes âgées dans le monde. Cette prévalence est bien plus élevée chez des patients atteints de diabète ou de cancers par rapport à celle de la population générale[8]. Sans intervention et compte tenu du vieillissement général de la population, la prévalence de la sarcopénie ne cessera d'augmenter dans les prochaines années et, par conséquent, le coût socio-économique associé également.

A noter que le vieillissement musculaire est différent de la sarcopénie, notamment chez l'homme. Alors que le vieillissement musculaire est un processus physiologique qui suit une trajectoire, la sarcopénie est une pathologie qui se déclare lorsque des caractéristiques fonctionnelles ou morphologiques sont perdues et détectées par le dépassement d'un seuil. Chez la souris, contrairement à l'homme, la distinction est cependant plus complexe, due à l'absence d'un seuil ou même d'un score permettant de caractériser cette pathologie.

Dans ce manuscrit de thèse, le terme « vieillissement musculaire » cité correspond à un vieillissement associé à la sarcopénie.

La sarcopénie est une pathologie multi causales. Nous allons donc énumérer les principales causes et modifications retrouvées au cours du vieillissement jouant un rôle dans cette pathologie (**Figure 1**).

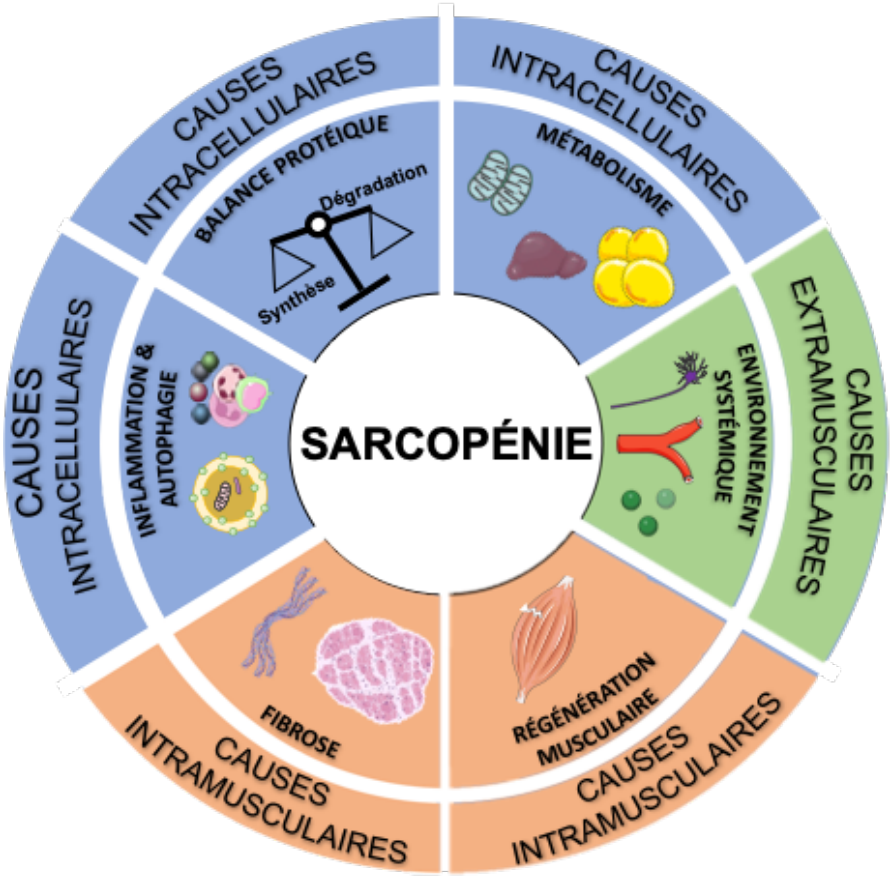


Figure 1 : **Les différentes causes de la sarcopénie.**
Les causes intracellulaires avec i) une inflammation exacerbée et une autophagie mal contrôlée, ii) une dérégulation importante de la balance entre synthèse et dégradation protéique et iii) une altération du métabolisme mitochondrial, lipidique et hépatique. Les causes intramusculaires avec i) une accumulation de collagène : la fibrose et ii) une altération des processus de régénération musculaire. Enfin les causes extra-musculaires avec un environnement systémique modifié avec une diminution de l'angiogenèse, de l'innervation et une modification des différentes hormones, cytokines et chimiokines.

I. La balance protéique : la protéosynthèse et la protéolyse protéique

Le muscle strié squelettique est composé de 75% d'eau, de 20% de protéines et de 5% des autres molécules telles que les lipides ou les glucides. Cette forte proportion protéique est notamment due aux besoins en protéines nécessaires à la prise de masse musculaire. La fine régulation de cette production protéique réside dans l'équilibre de la synthèse protéique (= la **protéosynthèse**) et de la dégradation des protéines (= la **protéolyse**). Cette balance protéique détient un rôle majeur dans le maintien de l'homéostasie musculaire.

Dans un premier temps, nous allons voir que la protéosynthèse fait intervenir le **ribosome** et les **protéines chaperonnes** alors que la protéolyse nécessite deux systèmes : le **système ubiquitine-protéasome** (= UPS) et **l'autophagie**. Dans un second temps, nous allons nous intéresser aux voies de signalisation responsables de ces deux processus. Enfin, nous détaillerons les dérégulations de ces voies observées au cours du vieillissement.

1. Les mécanismes de la protéosynthèse

a. Le ribosome : siège de la synthèse protéique

Dans la cellule eucaryote, la synthèse protéique est principalement réalisée par un complexe ribonucléoprotéique, appelé **le ribosome**. Il peut se trouver associé au réticulum endoplasmique (RE), à la membrane du noyau, aux mitochondries ou encore sous forme libre dans le cytoplasme. Afin de réaliser cette synthèse protéique, il y a différentes étapes dont l'initiation de la traduction, qui est, aujourd'hui, décrite comme la plus importante. Cette étape va nécessiter l'activation d'un complexe appelé mTORC1[9,10] comprenant la protéine mTOR (pour *mamalian target of rapamycin*), et son coactivateur Raptor[11]. Une fois ce complexe activé, les voies p70S6K[12,13] et 4EBP1[14,12,15] vont être activées par phosphorylation. L'inhibition de ce complexe, par la rapamycine (= inhibiteur spécifique de mTORC1)[16] apporte une preuve supplémentaire de l'implication indispensable de la protéine mTOR dans ce processus. En effet, cet inhibiteur empêche la phosphorylation de 4EBP1[17,18] et P70S6K[17,19,20] induisant une perte de la synthèse protéique (**Figure 3**).

A noter également que la protéine GSK3 peut subir une phosphorylation dite inhibitrice, engendrant la levée d'inhibition sur eiF2B, protéine qui permet la formation d'une sous unité du ribosome une fois activée. Cette levée d'inhibition favorise donc la synthèse des protéines[21,22] (**Figure 3**).

b. Les protéines chaperonnes

Une fois les protéines synthétisées par l'assemblage des acides aminés dans le ribosome, la phase de maturation des protéines est initiée par le repliement tridimensionnelle des protéines. La plupart des protéines peuvent la réaliser seule mais certaines s'associent avec des protéines chaperonnes. Ces protéines

chaperonnes aident au repliement des protéines nécessaire à leurs fonctions mais les protègent également des différents stress soumis. Enfin, elles empêchent l'agrégation protéique et réalisent également un « contrôle-qualité ». Dans cette grande famille, on retrouve les protéines de choc thermique : les Hsp (pour Heat Shok Protein). Ces protéines, comme l'indique leur nom, sont activées en cas de stress cellulaire comme la chaleur, et assurent leur rôle de protection ou de contrôle-qualité sur les protéines associées.

2. Les mécanismes responsables de la protéolyse

La dégradation protéique est un processus physiologique permettant de recycler les acides aminés, utiles pour la synthèse de nouvelles protéines. Deux systèmes permettent cette dégradation au sein du muscle squelettique : le **système ubiquitine-protéasome** (= UPS) et **l'autophagie**.

a. Le système ubiquitine-protéasome (UPS)

Bien qu'il existe deux voies de dégradation protéique dans le muscle squelettique, le système ubiquitine protéasome (UPS) est le plus utilisé[23]. Ce système dégrade les protéines nucléaires et cytosoliques. Il permet, *via* plusieurs réactions d'ubiquitination, de greffer des ubiquitines (= Ub), une protéine retrouvée dans tous les compartiments cellulaires, aux protéines en voie de dégradation. Ces ubiquitines sont alors considérées comme des signaux de dégradation afin que le protéasome 26S les prennent en charge. Plus en détail, la protéine va subir différentes réactions régies par trois classes d'enzymes : i) les E1 qui permettent l'activation de l'Ub, ii) les E2 qui conjuguent cette Ub à une E3 et enfin iii) les ligases E3. La chaine de poly-ubiquitination greffée va permettre de diriger les protéines vers le protéasome 26S afin de les dégrader[24].

Dans le muscle squelettique, deux ligases E3 ont été découvertes dans les années 2000 : la première est MAFbx/Atrogin-1(= Muscle Atrophy F-box)[25,26] et la deuxième s'appelle MuRF1 (= Muscle RING Finger 1)[26]. Ces deux protéines peuvent interagir avec la protéines MyoD[27] (= protéine clé dans le contrôle de la différenciation myogénique) ainsi qu'avec les protéines sarcomériques comme les chaines lourdes de myosine[28], Vin et Des[29]. L'Atrogin-1 peut, en plus, permettre la dégradation des

protéines du cytosquelette[29]. Ces différents complexes formés, comme dit ci-dessus, induisent une poly-ubiquitinylation des protéines cibles permettant une reconnaissance par le protéasome 26S et une dégradation (**Figure 3**). Un excès d'expression de ces deux protéines conduit à une atrophie musculaire, d'où leurs noms d'« atrogènes ».

b. L'autophagie

Il existe trois types d'autophagie connues : la **macro-autophagie**, **l'autophagie médiée par les protéines chaperonnes** et la **micro-autophagie**. Nous ne développerons dans ce manuscrit de thèse que la macro-autophagie, étant la plus étudiée et la plus détaillée dans la littérature. De plus, son implication dans de nombreuses pathologies musculaires est connue.

La macro-autophagie est définie comme un processus permettant de séquestrer des éléments du cytoplasme dans des vésicules à doubles membranes, appelées autophagosomes. Cet autophagosome va ensuite fusionner avec les lysosomes afin d'éliminer ces éléments du cytoplasme. Ce mécanisme permet principalement d'éliminer les composants cytoplasmiques. Il peut, cependant, en cas de jeûne, fournir des nutriments et de l'énergie pour maintenir l'homéostasie cellulaire. Enfin, il permet d'éliminer les mitochondries défectueuses, empêchant la formation d'espèces réactives de l'oxygène, connues sous le nom de ROS.

Le phénomène d'autophagie se déroule en cinq étapes : i) la formation du phagophore, ii) l'engloutissement du matériel cytoplasmique par celui-ci, iii) l'élongation de la membrane du phagophore, étape critique pour le processus, iv) la fusion des bords de celle-ci pour créer l'autophagosome et v) la fusion de l'autophagosome avec le lysosome, appelé l'autolysosome. Toutes ses étapes sont extrêmement contrôlées. Plus précisément, la formation du phagophore dépend de la présence d'un membre de la famille PI3-Kinase : la vps34. Cette enzyme forme un complexe avec Atg6 (= Beclin1), Atg14 et Vp150 (= p150). La deuxième étape, quant à elle, nécessite deux conjugaisons. La première conjugaison correspond à la « liaison » d'Atg12 avec Atg5 par Atg7 et l'interaction de ce complexe Atg5-Atg12 avec Atg16 correspondant à l'association avec le phagophore. La deuxième conjugaison, quant à elle, se réalise entre le LC3 (= Atg8) avec la phosphatidyléthanolamine (PE)

par Atg7 et Agt3, formant LC3-II[30]. Le matériel cytoplasmique à dégrader, appelé *cargo*, est alors piégé dans l'autophagosome. Le *cargo* se lie, après reconnaissance de l'étiquette de poly-ubiquitinations, à ses protéines adaptatrices (LC3/Atg8), *via* des « récepteurs » de l'autophagie dont fait partir p62 (= séquestrome 1)[31]. Ces récepteurs vont former un pont entre le *cargo* et l'autophagosome, permettant sa dégradation. Enfin, SNARE VAMP8 et VtiB régissent la fusion entre l'autophagosome et le lysosome, pour former l'autolysosome[32] (**Figure 2**).

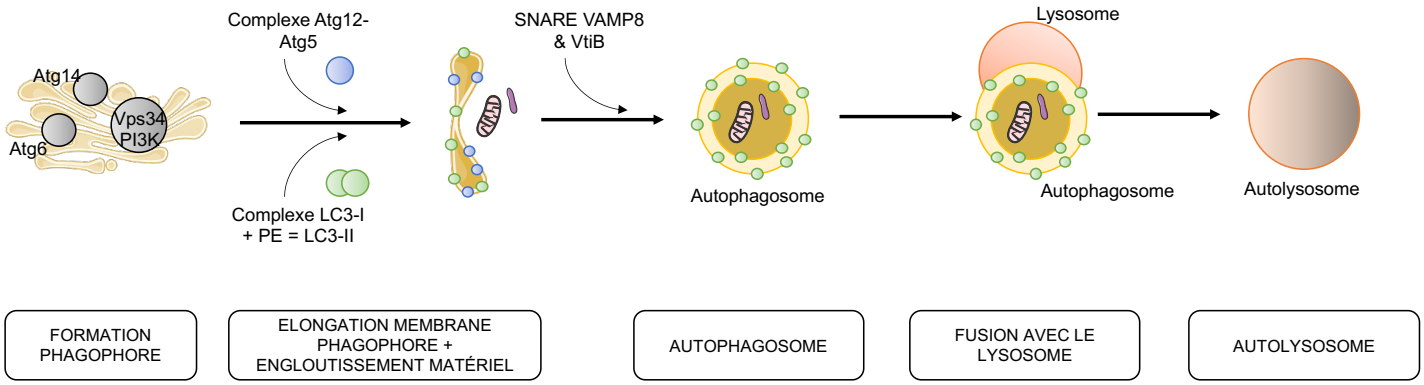


Figure 2 : **Les différentes étapes de l'autophagie**
Ce processus est réalisé en cinq étapes : i) la formation du phagophore, ii) l'engloutissement du matériel cytoplasmique par le celui-ci, iii) l'élongation de la membrane du phagophore, étape critique pour le processus, iv) la fusion des bords de celle-ci pour créer l'autophagosome et v) la fusion de l'autophagosome avec le lysosome, appelé l'autolysosome.

3. Les voies de signalisation régulant cette balance protéique

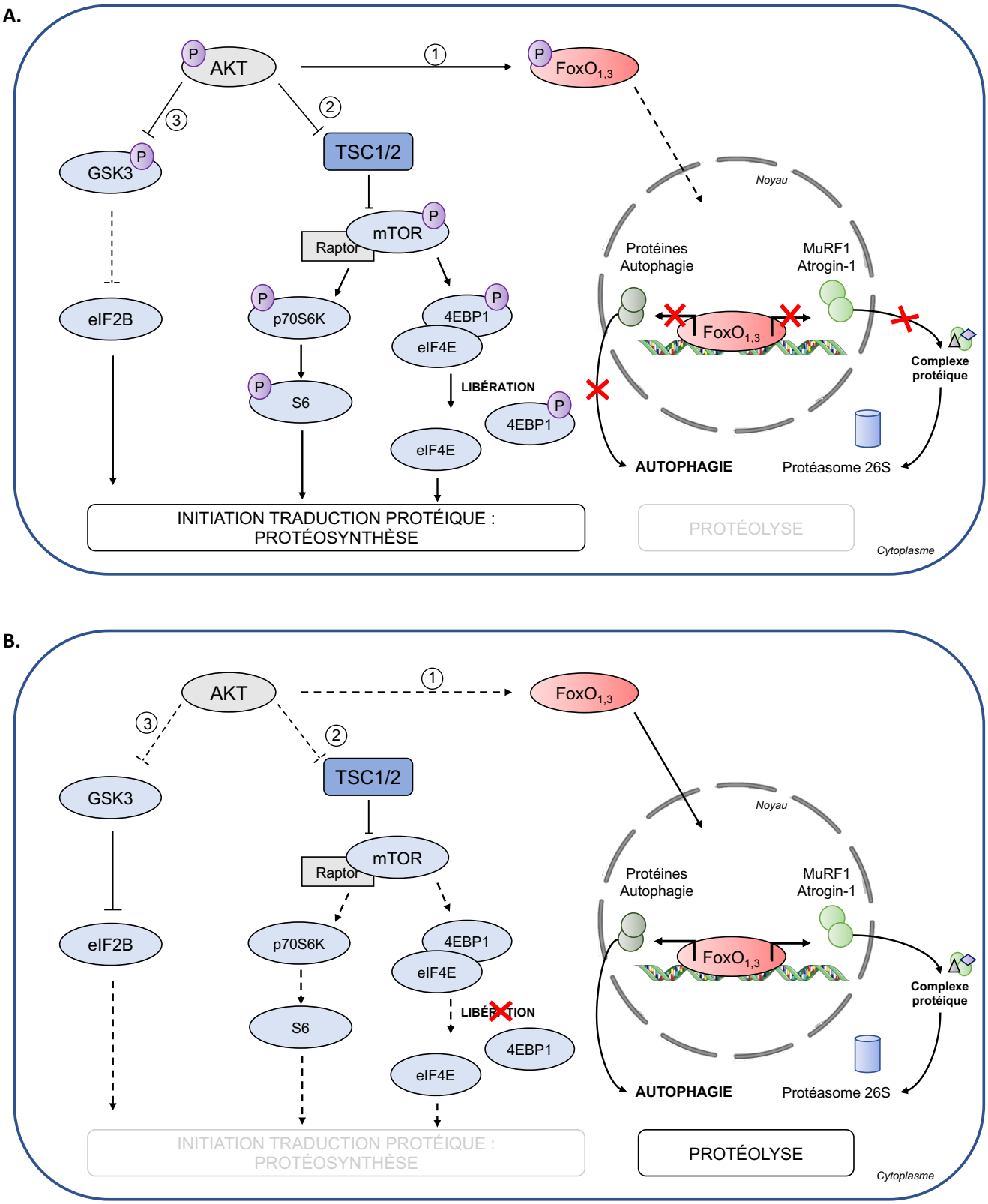
Cette balance entre synthèse et dégradation protéique est finement régulée au sein de la cellule musculaire grâce à différentes voies, dont deux majeures : la voie PI3K/AKT et la voie AMPK. De plus, concernant la synthèse protéique, la teneur en acides aminés et en glucose dans l'organisme détermine le rendement de ce processus.

a. Les voies majeures de la régulation de cette balance protéique : la voie PI3K/AKT

La protéine kinase B (PKB), connue sous le nom d'AKT, est une protéine serine-thréonine kinase qui possède un rôle central dans la régulation de la balance protéique au sein des cellules musculaires. En effet, elle permet d'activer les protéines

responsables de la synthèse protéique : 4EBP1 et p70S6K[10]. De plus, comme décrit précédemment, la protéine GSK3 subit une phosphorylation inhibitrice, réalisée par la protéine AKT afin de lever l'inhibition sur eiF2B[21,22] (**Figure 3**).

En parallèle, elle régule aussi le système UPS *via* le facteur de transcription FoxO[33] (= Forkheadbox O). La famille FoxO comprend six membres, tous exprimés dans le muscle squelettique. Cependant, seuls $FoxO_1$ et $FoxO_3$ sont impliqués dans l'atrophie musculaire. En effet, si ces facteurs de transcription sont transloqués dans le noyau, ils vont alors se fixer sur les promoteurs des gènes impliqués dans le système d'UPS tel que MuRF1 et Atrogin-1[34]. Cependant, l'activation de la protéine AKT permet d'inhiber ces protéines en les phosphorylant, conduisant ainsi à leur séquestration dans le cytoplasme, et inhibant leur rôle nucléaire[33] (**Figure 3**). Enfin, en 2011, une équipe montre que l'activation de la protéine mTOR par la voie PI3K/AKT permet de phosphoryler la protéine Ulk1 sur des résidus sérines757, inhibant son rôle dans l'autophagie[35].



<u>Figure 3</u> : Rôle de la voie AKT dans la protéosynthèse & la protéolyse
(A) L'activation de la protéine AKT par phosphorylation entraine ①la phosphorylation inhibitrice et séquestration dans le cytoplasme de $FoxO_3$ ②l'inhibition de TCS1/2 permettant une activation de la voie mTOR/Raptor/p70S6K/4EBP1 ③la phosphorylation inhibitrice de GSK3. **(B)** L'inactivation de la protéine AKT entraine ①une levée de l'inhibition sur $FoxO_3$ entraine sa translocation dans le noyau et l'activation des différents gènes cibles (autophagie, MuRF1, Atrogin-1)② une levée de l'inhibition sur les protéines TSC1/2 et GSK3.

b. Les voies majeures de la régulation de cette balance protéique : la voie AMPK

La protéine AMPK (= AMP-activated protein kinase) est une protéine sérine/thréonine kinase. Elle est extrêmement sensible à l'énergie métabolique puisque le ratio entre ADP/ATP va permettre son activation. Indépendamment de la concentration en AMP dans la cellule, la CaMKKβ permet aussi son activation en réponse à une augmentation du calcium extracellulaire, observée pendant une contraction musculaire par exemple.

Dans le muscle squelettique, l'exercice physique[36], un traitement à AICAR (= *5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside*)[37] ou encore une contraction induite par stimulation électrique[38] peuvent activer cette protéine par phosphorylation. En ce qui concerne son rôle dans la synthèse protéique, plusieurs études montrent un rôle d'inhibition. En effet, l'activation d'AMPK, en réponse à une diminution de l'ATP cellulaire, inhibe la synthèse protéique *via* : i) la phosphorylation activatrice sur les sites T1227 et S1345 de TSC2, inhibiteur de mTORC1[39,40] et ii) la phosphorylation inhibitrice des sites Ser722/792 de Raptor, la protéine régulatrice, associée à mTOR[40]. En plus de son rôle négatif sur la synthèse protéique, elle permet une activation des voies de la protéolyse. En effet, au cours d'une carence énergétique, la protéine AMPK active l'autophagie[41,35]. Enfin, l'AMPK peut activer la protéolyse dépendante du protéosome, par phosphorylation et activation des deux facteurs de transcription $FoxO_1$ et $FoxO_3$[41], permettant la transcription des deux atrogènes (MuRF1 et Atrogin-1), induisant une dégradation des protéines myofibrillaires[42] (**Figure 4**).

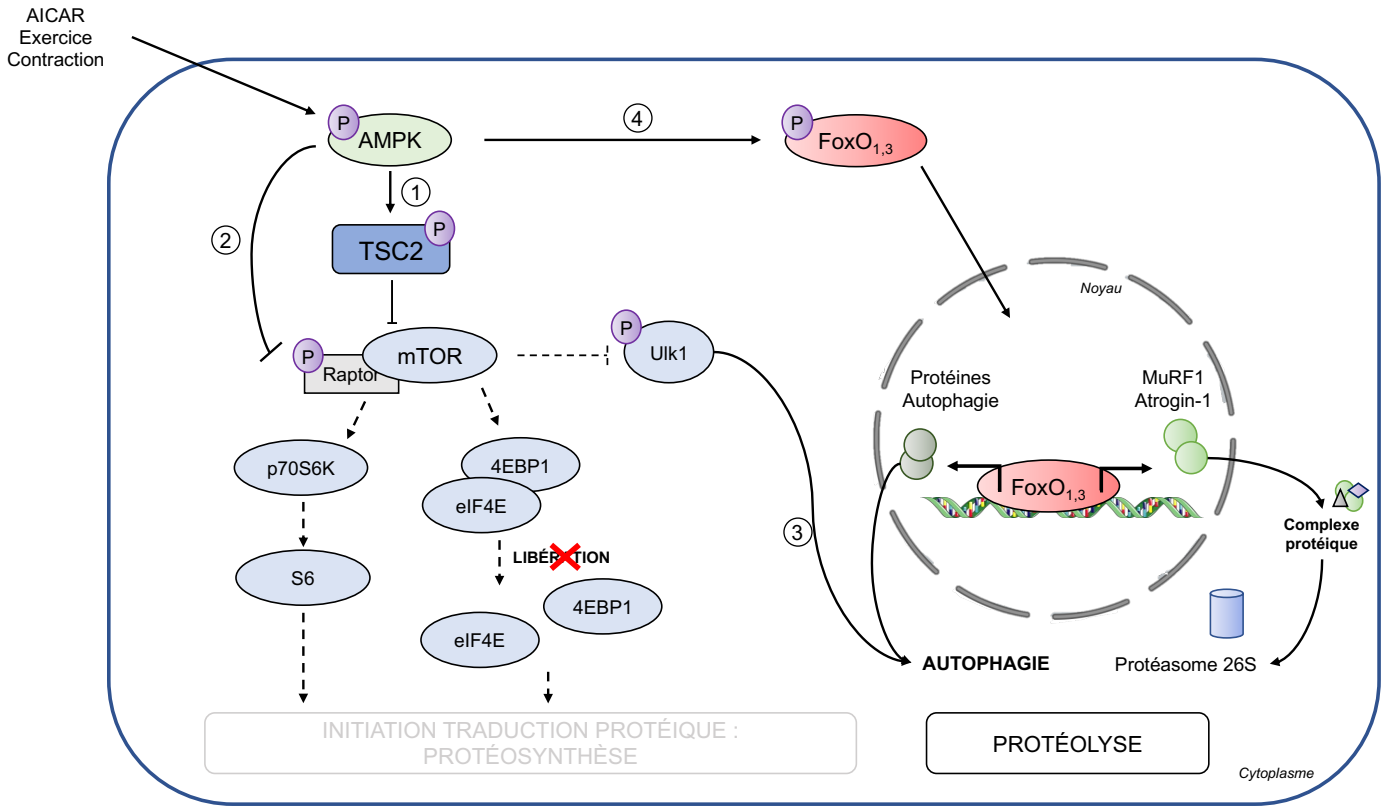


Figure 4 : Rôle de l'AMPK dans la protéolyse et la protéosynthèse
AICAR, l'exercice physique et la contraction musculaire vont venir activer la protéine AMPK. L'AMPK va ① activer par phosphorylation la protéine TSC2 ② inhiber la protéine Raptor ③ activer l'autophagie ④ activer $FoxO_{1,3}$.

c. Les autres voies impliquées dans la régulation de cette balance protéique : la voie NF-κB et la voie WNT

En plus des deux voies majeures (la voie PI3K/AKT et la voie AMPK) impliquées dans la régulation fine de cette balance, d'autres voies avec une importance moindre sont impliquées.

La voie NF-κB :

La voie NF-κB est une voie majeure dans la réponse aux signaux pro-inflammatoires et joue un rôle dans l'immunité innée, l'inflammation et l'apoptose. Dans le muscle squelettique, ce facteur de transcription influence la dégradation protéique. En effet, une étude montre que, dans différents modèles murins, l'expression constitutivement active de IKKβ spécifiquement dans le muscle

squelettique, de TWEAK[43] ou encore la dénervation du muscle induisent, une activation du facteur de transcription NF-κB, permettant ainsi l'activation du protéasome *via* l'expression de l'atrogène de MuRF1. Chez ces souris, un phénotype d'atrophie musculaire est alors observé[44].

La voie WNT :

La voie WNT est une voie de signalisation largement impliquée au cours du développement et de la vie adulte. Elle détient un rôle dans de nombreuses fonctions cellulaires. Les protéines de cette voie sont responsables de l'activation de deux voies de signalisation : i) une voie canonique où la liaison du ligand sur le récepteur permet de libérer la protéine β-caténine *via* l'inhibition de GSK3-β et ii) une voie non canonique dont la liaison permet d'activer soit la protéine Rho et la protéine JNK, soit la voie du calcium avec la protéine CamKII. L'activation de ces deux voies est dépendante du contexte cellulaire.

Il existe différents ligands de la voie WNT qui vont agir sur la trophicité musculaire. Pour ne citer que quelques exemples, le ligand WNT4, qui active la voie canonique, permet une meilleure expression des marqueurs de la différenciation musculaire (MRF4, Myogenine), conduisant à une hypertrophie musculaire[45]. Le ligand Wnt7a se lie au récepteur Fzd7 et active la voie non canonique. Les voies activées diffèrent en fonction de la cellule cible : par exemple, dans les myotubes, il a été montré que cette liaison va activer la voie PI3K/AKT/mTOR et induire une hypertrophie musculaire *via* la protéine S6[46].

LA BALANCE PROTEIQUE :

- La balance protéique est finement régulée par la protéosynthèse et la protéolyse.
- La voie AKT active la protéosynthèse et inhibe la protéolyse.
- La voie AMPK active la protéolyse et inhibe la protéosynthèse.
- Il existe d'autres voies mineures impliquées dans cette régulation : la voie NF-κB et la voie WNT.

4. Les dérégulations de ces voies et les conséquences associées sur la balance protéique au cours du vieillissement

Au cours du vieillissement, différents changements amènent un déséquilibre en faveur de la dégradation protéique, jouant un rôle primordial dans la fonte et l'atrophie musculaire. Nous allons, dans cette partie, décrire les altérations concernant : i) les protéines chaperonnes, ii) l'autophagie, iii) la voie PI3K/AKT et iv) la voie AMPK.

Les protéines chaperonnes :

Au cours du vieillissement, la protéine chaperonne Hsp70 se retrouve diminuée dans le muscle squelettique[47,48]. Une étude montre son implication dans la perte de la force musculaire retrouvée chez des souris âgées puisque sa surexpression permet d'empêcher cette diminution et induit également une récupération complète après un stress[49].

L'autophagie :

Des preuves de plus en plus nombreuses indiquent qu'au cours du vieillissement, l'altération de la formation des autophagosomes et de l'activité lysosomale détériore le processus d'autophagie, induisant une augmentation des agrégats protéiques, nuisibles à l'homéostasie cellulaire[50]. De plus, l'accumulation de lipofuscine (= protéine accumulée en cas de digestion non complète, indicateur distinct de la dysfonction lysosomale) chez des souris âgées confirme une diminution importante de l'activité lysosomale. Enfin, des études réalisées sur C. Elegans ou sur la drosophile confirment ces résultats puisqu'une déficience de ce système (par mutations des protéines clés tels que Atg1, Atg7…) induit une diminution de l'espérance de vie, preuve de l'importance de cette voie dans le vieillissement[51,52].

La voie PI3K/AKT et la voie AMPK :

Comme déjà cité, le vieillissement est associé à une faiblesse et une atrophie du muscle squelettique, caractérisée par une augmentation de la dégradation protéique et une diminution marquée de la synthèse protéique. De nombreuses études ont montré une moindre sollicitation de la voie PI3K/AKT au cours du vieillissement, impactant autant la protéosynthèse que la protéolyse. Tout d'abord, concernant la synthèse protéique, les muscles des souris âgées montrent une diminution des

protéines cibles d'AKT sous forme totale telles que mTOR, P70S6K, la protéine S6 ribosomale[53], 4EBP1 ou encore GSK3[54]. De plus, le défaut de phosphorylation de certaines de ces protéines est en partie dû à une S-nitrosylation d'AKT mais peut être également dû à une augmentation du ratio AKT^{Ser473}/AKT^{Th308}, traduisant une hyper-phosphorylation[55]. A noter que certaines études montrent cependant une diminution de la phosphorylation d'$AKT^{Ser47356}$. Cette différence peut être due au type de muscle squelettique étudié. Tous ces changements traduisent un défaut de la synthèse protéique au cours du vieillissement.

En ce qui concerne la dégradation protéique, comme énoncé ci-dessus, la voie PI3K/AKT est impliquée dans la séquestration des facteurs de transcription FoxO. Cependant, l'implication de ces facteurs de transcription dans la surexpression des atrogènes au cours du vieillissement est aujourd'hui encore très controversée. Certaines études montrent une diminution de la phosphorylation de FoxO suivi d'une augmentation de la régulation des deux atrogènes dans le muscle de rats âgés[56]. Toutefois, d'autres études révèlent une diminution de la phosphorylation de FoxO, suivie d'une diminution de l'expression de MuRF1 et d'Atrogin-1, excluant le rôle de ces deux atrogènes dans la sarcopénie[57]. Le cadre d'étude ainsi que le matériel biologique utilisés (cellules humaines ou murines) sont différents et peuvent expliquer les contradictions entre ces différentes études. De plus, la définition de la sarcopénie varie souvent d'une étude à l'autre, créant alors un biais (**Figure 5**).

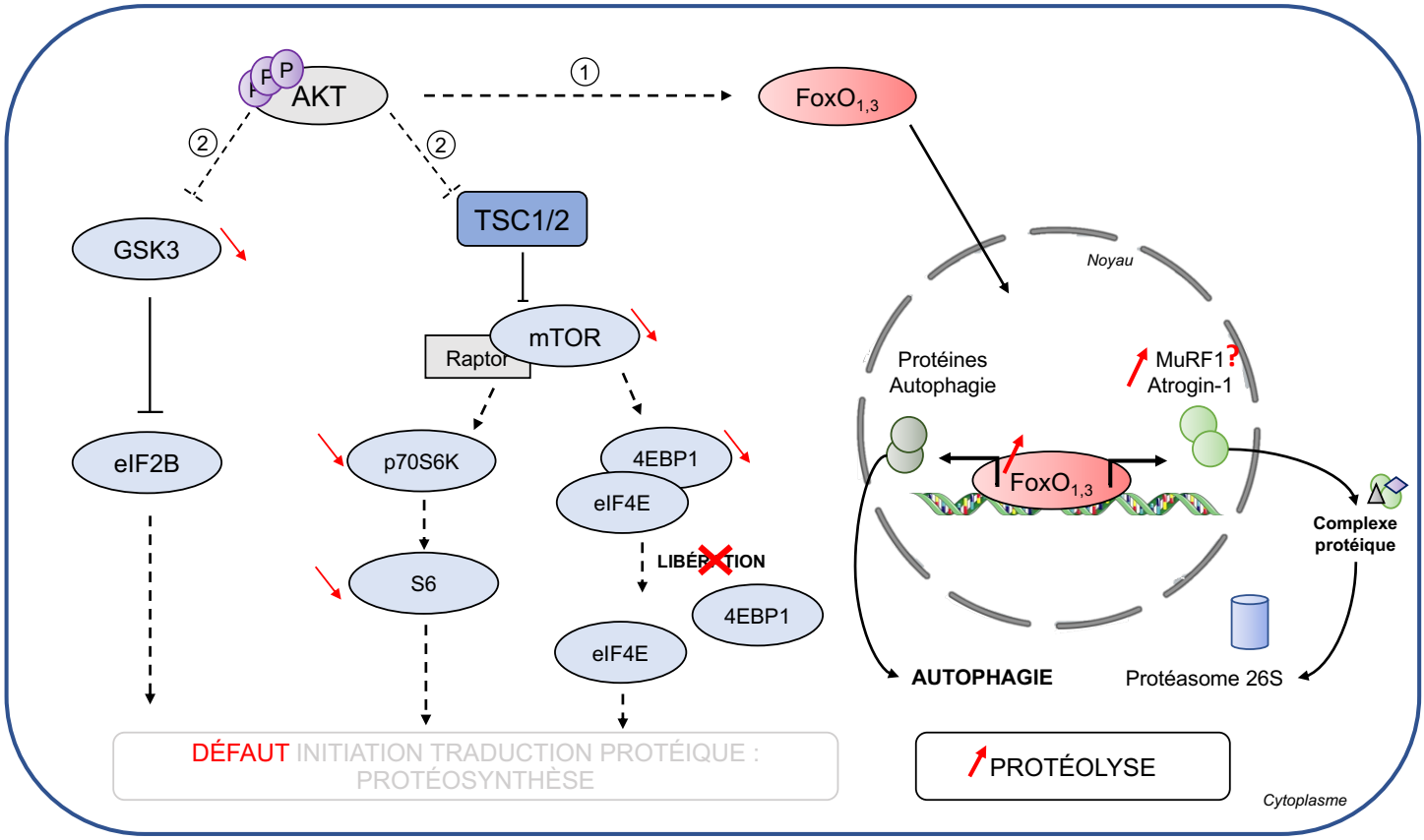


Figure 5 : Dérégulations de la voie AKT au cours du vieillissement et conséquences associées
Au cours du vieillissement, l'hyper-phosphorylation d'AKT entraine ①une hypo-phosphorylation de $FoxO_3$, associée à une augmentation des atrogènes, bien qu'encore débattu dans la littérature. Ces modifications entrainent une augmentation de la protéolyse ②une hypo-phosphorylation des protéines TSC1/2 et GSK3, entrainant une levée de l'inhibition de ces protéines et à terme un maintien d'un défaut de la protéosynthèse.

Pour conclure sur les dérégulations liées au vieillissement, il semblerait que la sensibilité de l'activation de l'AMPK soit diminuée, lors d'une contraction par stimulation électrique, d'un exercice ou lors d'un traitement à l'AICAR, entrainant une diminution de la biogenèse mitochondriale[58]. La perte d'activité de cette voie associée à l'âge est un facteur important dans la contribution des dysfonctions métaboliques observées avec le vieillissement. De plus, il a été montré que l'inflammation de bas bruit observée au cours du vieillissement induisait sa moindre activation. Suite à ces défauts, les cibles de l'AMPK (Ulk1, $FoxO_{1,3}$) sont impactées et les processus, principalement des processus de dégradation protéique, sont altérés[59].

LA BALANCE PROTEIQUE & LE VIEILLISSEMENT :

En résumé, le vieillissement induit des altérations de cette balance protéique, qui comprend :

- La diminution de l'expression de certaines protéines chaperonnes comme Hsp70.
- L'altération du processus d'autophagie, observée par une augmentation des agrégats protéiques et une diminution de l'activité lysosomale.
- La moindre sollicitation de la voie PI3K/AKT, observée avec la diminution des protéines impliquées dans la protéosynthèse (mTOR, p70S6K, 4EBP, GSK3).
- Une diminution de la sensibilisé de l'AMPK lors d'une contraction, d'un exercice ou d'un traitement à l'AICAR.

II. Le métabolisme mitochondrial

1. Les mitochondries : organites clé du métabolisme

Les mitochondries sont des organites intracellulaires, retrouvées dans toutes les cellules eucaryotes. Elles possèdent leur propre génome circulaire et jouent le rôle de « centrale énergétique », permettant de fournir l'énergie nécessaire à la cellule. En effet, grâce à la chaîne respiratoire mitochondriale et aux électrons, elles utilisent le pouvoir réducteur issu de l'oxydation des molécules organiques afin de former des molécules d'ATP, l'une des sources d'énergie pour la cellule. Dans le cas des muscles squelettiques, elles sont essentielles pour fournir l'énergie nécessaire à la contraction musculaire.

Biogenèse – Dynamisme – Fonctions :

La biogénèse mitochondriale se caractérise par l'expansion mais également la division des mitochondries préexistantes au sein d'une cellule. Le régulateur central de ce processus est PGC1-α (= Peroxisome Proliferator–Activated Receptor F Coactivator 1). Il va venir se lier à NRF2 (pour Nuclear Respiratory Factors 2), entrainant la co-activation de NRF1 (= Nuclear Respiratory Factors 1). Ces deux facteurs permettent la régulation des gènes nucléaires importants pour les fonctions oxydatives comme les gènes codant pour les protéines de la phosphorylation (gène codant pour le cytochrome C ou encore le complexe IV par exemple). NRF1 et NRF2 permettent également de réguler la transcription de TFAM (= Mitochondrial Transcription Factor A)[60] qui joue un grand rôle dans la transcription et réplication de l'ADN mitochondrial[61]. Une fois les protéines d'origine nucléaire codées, elles seront

acheminées vers les mitochondries grâce à des protéines chaperonnes[62]. Dans la mitochondrie, ces protéines vont venir s'assembler aux protéines d'origine mitochondriales, synthétisées grâce à TFAM, et peut provoquer, lors de la mitose par exemple, la fragmentation de la mitochondrie par le mécanisme de fission.

La fusion & la fission mitochondriales :

Au sein d'une cellule, le réseau mitochondrial est très dynamique, permettant d'avoir une flexibilité afin de s'adapter aux contraintes cellulaires et métaboliques. La fusion et la fission sont des processus antagonistes et fondamentaux de ce dynamisme. Brièvement, la fission correspond à l'étranglement d'une mitochondrie mettant en jeu différentes protéines. Elle a lieu pour permettre aux mitochondries d'entrer dans le processus de mitophagie (détaillée ci-dessous). Ce processus est initié par la protéine dynamine Drp1[63]. On peut le décrire en plusieurs étapes avec i) le marquage des sites avec hFis1 et Mff,[64,65], ii) le recrutement de Drp1 sur les sites de fusion et enfin iii) une constriction et un « pincement » de la mitochondrie afin de générer deux mitochondries filles. En ce qui concerne la fusion, elle permet de créer un réseau entre les différentes mitochondries et favorise les échanges entre elles. Elle est contrôlée également par des GTPases que sont les Mitofusines 1 & 2 (= Mfn1 & Mfn2), et une dynamine nommée OPA1 (= Optic Atrophy 1)[66]. Il existe deux types de fusion : la fusion complète qui correspond à la fusion des membranes internes et externes des mitochondries et la fusion dite transitoire, qui correspond à la fusion seulement des membranes externes. Afin de réaliser la première, OPA1 s'associe aux mitofusines[67]. Dans le cas de la deuxième, on observe un clivage d'OPA1, inhibant la formation du complexe OPA1-mitofusines.

Au sein d'une cellule, on observe une fine régulation de la balance entre fusion et fission mitochondriale (Mfn2/Drp1) qui va impacter des fonctions cellulaires comme la fragmentation du réseau mitochondrial, le processus d'apoptose, la production des ROS, la réplication de l'ADN mitochondrial.

Comme décrit ci-dessus, ces deux processus permettent des changements de forme des mitochondries ainsi que de leur organisation en réseau. De cette manière, on peut ainsi observer au sein du muscle squelettique deux populations, différant par leurs localisations et leurs fonctions. On retrouve les mitochondries sub-sarcolemmales (= les mitochondries SS), localisées sous la membrane plasmique des

cellules musculaires, et les mitochondries inter-myofibrillaires (= les mitochondries IMF) localisées entre les myofibrilles de la fibre musculaire[68]. Il a été montré que ces deux populations de mitochondries, pourtant distinctes, interagissaient entre elles, *via* une continuité physique[68]. Au niveau de leur forme, les mitochondries SS sont plutôt sphériques et isolées alors que les mitochondries IMF sont tubulaires, allongées et ramifiées. A noter que la taille ne semble pas différer entre ces deux populations de cellules. Concernant leurs fonctions, les mitochondries IMF, par rapport aux SS, ont une expression plus importante des protéines des complexes de la chaine respiratoire, du transport et de la métabolisation des protéines, leur conférant une meilleure production d'énergie mais également une capacité de phosphorylation oxydative supérieure[69].

La mitophagie :

Les mitochondries altérées sont éliminées par le processus d'autophagie, appelé dans ce contexte : la **mitophagie**. Ce processus permet donc de renouveler les mitochondries afin de maintenir l'homéostasie cellulaire. Plus, en détail, quand une mitochondrie est altérée dans la cellule, PINK1 (= PTEN-Induced Putative Kinase 1) s'accumule sur la membrane externe de la mitochondrie. Cette accumulation est considérée comme le signal de dégradation et va permettre le recrutement de Parkin, une E3 ligase, par VDAC. Cette E3 ligase ubiquitine les protéines présentes à la surface de la membrane externe des mitochondries. De la même manière que pour l'autophagie des protéines, ces marques d'ubiquitination vont se lier au « récepteur » p62 et à LC3-I entrainant la formation de l'autophagosome et sa dégradation[70]. Le rapport Parkin/VDAC est alors un bon marqueur du potentiel mitophagique.

LES MITOCHONDRIES :

Pour résumer :

- La biogenèse mitochondriale peut se définir par la croissance et la division des mitochondries préexistantes.
- L'autophagie de la mitochondrie est nommée mitophagie et permet la dégradation des mitochondries endommagées et assurent le renouvellement.
- Le réseau mitochondrial est dynamique, grâce au processus de fission et fusion.
- Deux sous populations de mitochondries sont présentes dans le muscle : les SS et les IMF.

2. Les altérations au sein des mitochondries liées au cours du vieillissement

Le vieillissement est associé à une accumulation des mitochondries. Il existe des altérations au niveau : i) de la morphologie, ii) de la quantité des mitochondries, iii) de la qualité des mitochondries et enfin iv) dans le processus de mitophagie. Nous allons dans cette sous partie détailler toutes ces altérations.

Gouspillou et ses collaborateurs ont observés, en 2015, que les deux populations de mitochondries subissent des modifications au niveau de leur morphologie. En effet, dans un muscle *gastrocnemius* de souris âgée, les mitochondries SS sont plus grandes et moins circulaires/globulaires alors que les mitochondries IMF sont plus longues et beaucoup plus complexes. Ces observations sont expliquées par un ratio fusion/fission altéré, en faveur de la fusion, au cours du vieillissement[71]. Ces changements de forme mitochondriale impactent leur fonction et induit des dysfonctionnements cellulaires.

Concernant la quantité des mitochondries, une étude démontre une diminution du contenu mitochondrial dans les muscles squelettiques des souris âgées[72]. Cependant, ce résultat est controversé par des travaux qui démontrent que celui-ci est identique entre les muscles squelettiques d'une souris jeune ou âgée[71]. Ces divergences de résultats peuvent être expliqués par une différence dans les approches utilisées. En effet, le contenu mitochondrial est calculé de différentes manières : i) mesure des protéines ou enzymes mitochondriales telles que la citrate synthase du cycle de Krebs, les protéines des complexes de la phosphorylation oxydative, ii) le marquage de la SDH, iii) quantification de la densité en mitochondries par TEM et iv) le contenu en ADNmt (= ADN mitochondrial).

En plus de l'impact sur la quantité mitochondriale, l'âge va également influencer la qualité des mitochondries, engendrant des pertes de fonction au niveau de la biogenèse mitochondriale et de sa réponse en demande énergétique. En effet, comme expliqué précédemment, les mitochondries sont le réservoir énergétique de la cellule grâce à la production de la molécule phare : l'ATP. Une étude démontre que cette production ne cesse de diminuer au cours du vieillissement[73]. En effet, les activités de certains complexes de la chaine respiratoire sont diminuées. Ces altérations entravent

les capacités des mitochondries à transférer efficacement les électrons le long de la chaine respiratoire[74], diminuant les capacités des phosphorylations oxydatives[75].

Enfin l'élimination des mitochondries, par le processus de mitophagie, est primordial dans le bon fonctionnement cellulaire. En effet, il permet d'éviter l'induction de dommages provoqués par les mitochondries défectueuses. Comme cité ci-dessus, le rapport Parkin/VDAC est alors un bon marqueur du potentiel mitophagique. Alors qu'au cours du vieillissement, le contenu et la localisation des protéines impliquées dans la mitophagie (Parkin, p62, LC3-II et Fis1) ne sont pas impactées[76,77] , le potentiel mitophagique[77] mais également les étapes en aval du processus, nécessitant le lysosome[76], sont altérées. Ces altérations contribuent, alors, à l'accumulation des mitochondries dysfonctionnelles au cours du vieillissement.

ALTÉRATIONS DES MITOCHONDRIES LIÉES AU VIEILLISSEMENT :

En résumé, on observe différentes altérations liées au vieillissement au sein du réseau mitochondrial :

- Les mitochondries sont de plus grande taille.
- Bien que controversé dans la littérature, le contenu mitochondrial semble diminué.
- Une perte de certaines fonctions mitochondriales comme la biogenèse mitochondriale ou la production d'ATP est observée.
- La perte du potentiel mitophagique ainsi que des étapes impliquant le lysosome induisent une accumulation de mitochondries défectueuses.

III. La régénération musculaire

Lorsqu'un organe subit des agressions ou des traumatismes, deux possibilités sont observées. Il peut soit régénérer afin de reformer des cellules matures qui permettent de maintenir une fonction, soit il réalise un processus de cicatrisation qui permet de combler la perte des cellules matures suite à la blessure mais ne permet pas de maintenir les fonctions intactes. Si l'organe subit un nombre important de lésions ou des lésions trop invasives, la cicatrisation devient majoritaire et apparait un phénomène de fibrose. Nous allons détailler dans un premier temps les processus de régénération musculaire ainsi que les altérations observées au cours du vieillissement puis dans un second temps, nous allons rapporter le phénomène de fibrose et les dérégulations liées au vieillissement.

Le muscle est un organe soumis à de nombreux dommages tout au long de la vie d'un individu tels que des traumatismes mécaniques (dénervation, contusion, lacération, déchirure) ou encore des agents toxiques (cardiotoxine, $BaCl_2$, neurotoxine, lidocaïne et bupivacaïne)[78]. Pour y faire face, le muscle est l'un des seuls organes chez le mammifère à posséder une grande capacité de régénération[79]. Dans le muscle squelettique, ce processus est apparenté au programme de myogenèse retrouvé lors de l'embryogenèse et dure entre 14 et 21jours pour retrouver une morphologie et une fonction musculaire complète, chez la souris. Cependant, il existe des différences avec l'embryogénèse, notamment au niveau du microenvironnement avec la présence des cellules immunitaires sur le site de lésion.

La régénération musculaire est un processus coordonné, avec différentes phases ayant lieu en parallèle les unes des autres. On retrouve i) une phase inflammatoire, caractérisée par une phase de dégénération des fibres lésées, une nécrose des fibres musculaires, associée à une infiltration des cellules immunitaires, ii) une phase de régénération, marquée par une activation, une prolifération et une différenciation des cellules satellites afin de reformer de nouvelles fibres régénérantes, enfin iii) une phase de remodelage et de réparation du tissu lésé avec une réorganisation du tissu extracellulaire, nerveux et vasculaire[80]. Cette dernière phase est caractérisée par un remodelage du tissu conjonctif associé à de l'angiogenèse et enfin par la récupération fonctionnelle des muscles squelettiques blessés. Cette dernière phase est assez lointaine dans le processus de régénération musculaire qui nous intéresse dans ce manuscrit et ne sera pas détaillée.

La capacité de régénération musculaire réside principalement sur les cellules souches du muscles, appelées cellules satellites. Nous allons dans un premier temps décrire les différentes caractéristiques des cellules souches, puis détailler les différentes phases de ce processus régénératif.

1. La cellule responsable de la régénération : la cellule satellite

Les cellules satellites sont les cellules souches spécifiques du muscle et ont été découvertes en 1961 par Alexander Mauro par microscopie électronique[81]. Elles sont localisées entre la lame basale et la membrane des fibres musculaires et sont

caractérisées par différents marqueurs qui ont permis de les étudier comme cMet, Pax_7[82], $\alpha 7/\beta 1$ integrin, CD34[83], Syndecan3 et 4[84], M-cadherin[85], caveolin-1, VCAM et CXCR4.

Dans cette partie nous allons détailler les différentes caractéristiques que possèdent les cellules souches musculaires.

→ L'hétérogénéité de la population :

Longtemps considérée comme une population homogène, beaucoup d'études démontrent qu'il existe « différentes » populations de cellules satellites. En effet, les cellules satellites exprimant $CD34^+/Myf5^+/M\text{-}cadherin^+$ ne représentent que 80% de la population totale de cellules satellites. Un petit pourcentage des cellules satellites est $CD34^-/Myf5^-/M\text{-}cadherin^-$ et est impliqué dans la maintenance du *pool* de ces cellules[83]. En effet, une étude a démontré que des cellules satellites $Myf5^-$, localisées à proximité de la lame basale, sont capables de se diviser de manière symétrique et asymétrique (détaillé ci-dessous), permettant le maintien du réservoir des cellules souches musculaires. Il semble important de noter que ces cellules sont capables de donner les deux types de cellules satellites : $Pax7^+/Myf5^+$ (cellules engagées dans le processus myogénique) et $Pax7^+/Myf5^-$ (cellules responsables du maintien du *pool* de cellules souches)[86]. Enfin, une étude menée par Chakkalakal et ses collaborateurs a montré qu'au sein du *pool* de cellules souches, dès la naissance, certaines cellules ont un grand potentiel d'auto-renouvèlement alors que d'autres possèdent un grand potentiel de division cellulaire avec une entrée en différenciation. Ces deux populations réapparaissent après une blessure ou une agression musculaire[87].

→ L'état de quiescence :

Dans un muscle non lésé, les cellules satellites sont caractérisées par un état de quiescence ($Pax7^+/Ki67^-$). Cet état de quiescence est un arrêt transitoire et réversible du cycle cellulaire pendant la phase G1. Ces cellules quiescentes présentent différentes caractéristiques qui permet de les identifier : i) une plus petite taille, ii) un contenu faible en ARN et protéines et iii) des besoins énergétiques inférieurs à des cellules prolifératives[88]. De ce fait, elles ont une faible activité mitochondriale et

possèdent principalement un métabolisme oxydatif (oxydation des acides gras et du pyruvate)[89]. En plus de ces différentes caractéristiques, ces cellules expriment différents marqueurs tels que M-cadherin, l'ozd4 ou encore l'endothelin3 et le Chordin-like 3[90]. Par exemple, l'expression de la Calcr permet de réguler la quiescence par la signalisation AMPc/PKA. De plus, l'absence de l'antigène Ki67 peut participer à cette identification.

Plusieurs processus clés permettent de maintenir cet état de quiescence. Tout d'abord, la cellule surexprime des *Cyclin-dependent kinase inhibitors* (CDKi)[90] permettant un arrêt du cycle cellulaire. En effet, comme le montre l'article de Chakkalakal et ses collaborateurs en 2014, l'expression de la CDKi « p27 » dans un sous-ensemble de cellules satellites permet de maintenir un état dit « primitif »[87]. La cellule va également exprimer la protéine Sprouty-1[91] qui permet d'inhiber la signalisation FGF-2 (= *fibroblast growth factor 2*, molécule impliquée dans l'activation et la prolifération des cellules satellites)[92]. L'expression de cette protéine permet également à un certain nombre de cellules, après une activation, un retour à l'état de quiescence, confirmé chez des souris délétées pour Sprouty-1[91]. Pour finir, les cellules souches expriment différents gènes permettant d'inhiber la myogenèse, de bloquer leur activation ou encore de maintenir un état de quiescence par arrêt du cycle cellulaire[90].

En plus de l'expression de ces différentes protéines, ces cellules quiescentes vont être « immobilisées », au sein de la niche, grâce à plusieurs protéines. Ainsi, la M-cadhérine, une protéine présente sur les cellules satellites, permet une liaison entre les cellules et la membrane des myofibres[85], de même que pour α_7-integrin et β_1-integrin. Enfin, ces cellules quiescentes vont fortement exprimer les *Tissue Inhibitors of MetalloProteinases* (= TIMPs), des inhibiteurs de métalloprotéases, les séquestrant dans la niche.

Longtemps considéré comme étant des cellules inactives, différentes études ont pu démontrer qu'il existait au sein de cette population une hétérogénéité. Tout d'abord, Rocheteau et ses collaborateurs ont pu démontré qu'il existait une expression différentielle de Pax_7 (= paired box 7) au sein de la population des cellules satellites quiescentes[93]. Ce facteur de transcription (marqueur connu des cellules satellites dont l'expression est diminuée lors de la différenciation), peut-être exprimé de manière

importante dans certaines cellules satellites (= Pax_7^{high}). Ce haut niveau de Pax_7 témoigne d'un état de quiescence plus profond (état de quiescence « dormant ») puisque les cellules mettent plus de temps à s'activer, s'engagent moins dans le lignage myogénique et possèdent une activité métabolique plus faible que les cellules ayant une plus faible expression de cette protéine (=Pax_7^{low}). On peut donc énoncer l'existence d'un continuum de l'état de quiescence, défini, en partie, par l'expression de Pax_7[93]. De plus, concernant ce facteur de transcription, il a été également défini comme essentiel pour la régénération musculaire puisque sa perte, dans les cellules myogéniques, entraine une altération des processus de régénération associée à une baisse du nombre de cellules $Pax7^+$ et/ou $CD34^+$ retrouvées sur les nouveaux myotubes formés. De plus, un petit nombre de ces cellules présente dans la niche sont suffisantes pour initier la régénération et la réparation musculaire. A noter qu'une absence de ces cellules n'impacte pas la physiologie du muscle en condition basale[94]. Une blessure ou un challenge semble nécessaire pour que la cellule satellite devienne indispensable.

Ensuite, il existe une transition dynamique dans l'état de quiescence. Rodgers et ses collaborateurs parlent d'un cycle de quiescence au sein du cycle cellulaire lui-même. Ce cycle de quiescence comprend deux phases : la phase de quiescence « classique » G_0 et une phase de quiescence G0/G1, nommée également G_{alert}. Les cellules quiescentes en « alerte » sont présentes dans le muscle de la patte controlatérale de celle de la blessure[95]. Cet état est réversible et les cellules sont capables de retrouver des propriétés des cellules quiescentes « classiques ». Cependant, quand les cellules se retrouvent dans cet état G_{alert}, elles possèdent des caractéristiques à l'interface entre des cellules quiescentes et des cellules activées. En effet, par rapport à des cellules quiescentes « classiques », elles présentent une augmentation de leur taille, une entrée plus rapide dans le cycle cellulaire et une augmentation de l'activité mitochondriale[95]. De plus, ces cellules ont des capacités accrues pour la régénération musculaire. A noter que ces cellules sont toujours caractérisées par un état de repos. Seulement, cet état G_{alert} prépare la cellule à une activation potentielle. La transition entre ces deux états est sous le contrôle de la signalisation mTORC1[95]. Plus en détails, certains facteurs systémiques qui apparaissent dans la circulation générale après une blessure (comme par exemple HGFA) permettent une activation de la voie cMet-$mTORC_1$[96]. L'activation de cette voie permet aux cellules d'acquérir ce phénotype particulier (G_{alert}). De plus, une étude

menée par Rodgers et ses collaborateurs en 2014 démontre qu'une inhibition de la voie mTORC1 entraine une absence de l'état G_{alert} et une insensibilité à la blessure[96].

→ ***La capacité d'auto-renouvèlement :***

Comme toutes cellules souches, les cellule satellites ont la capacité de maintenir un *pool* nécessaire pour d'autres blessures par la capacité d'auto-renouvèlement. Ces cellules diminuent l'expression de MyoD, augmentent celle de Pax_7 et enfin sortent du cycle cellulaire[97]. L'auto-renouvèlement est possible grâce à deux types de divisions : la **division symétrique** et la **division asymétrique**.

La division asymétrique permet d'obtenir une cellule qui entre dans le programme myogénique et une cellule qui reste à l'état « primitif » ce qui permet de maintenir le *pool* de cellules souches musculaires. Elle dépend, en partie, de l'expression de certaines protéines au sein des cellules comme par exemple Myf_5[86]. En effet, les cellules qui expriment ce facteur s'engagent dans la prolifération puis dans la différenciation myogénique alors que celles qui ne l'expriment pas vont être capables de reformer le *pool* de cellules souches quiescentes. Cette division asymétrique est permise, également, par la position des cellules. En effet, on dit que la division a une position apico-basale et est donc perpendiculaire à la myofibre. De cette manière, une des deux cellules reste attachée à la lame basale, et correspond à la cellule Myf_5^-. L'autre cellule fille va être poussée vers la myofibre et correspond à la cellule Myf_5^{+86}.

La division symétrique, quant à elle, ne permet que le maintien du *pool* de cellules souches. En effet, les deux cellules filles, lors de cette division, vont rester à l'état de quiescence. De la même manière que pour les divisions asymétriques, la position des cellules impacte cette division symétrique. Elle est planaire, ce qui signifie que la cellule est parallèle à la myofibre. De cette manière, les cellules restent en contact direct avec la lame basale et les myofibres hôtes (**Figure 6**).

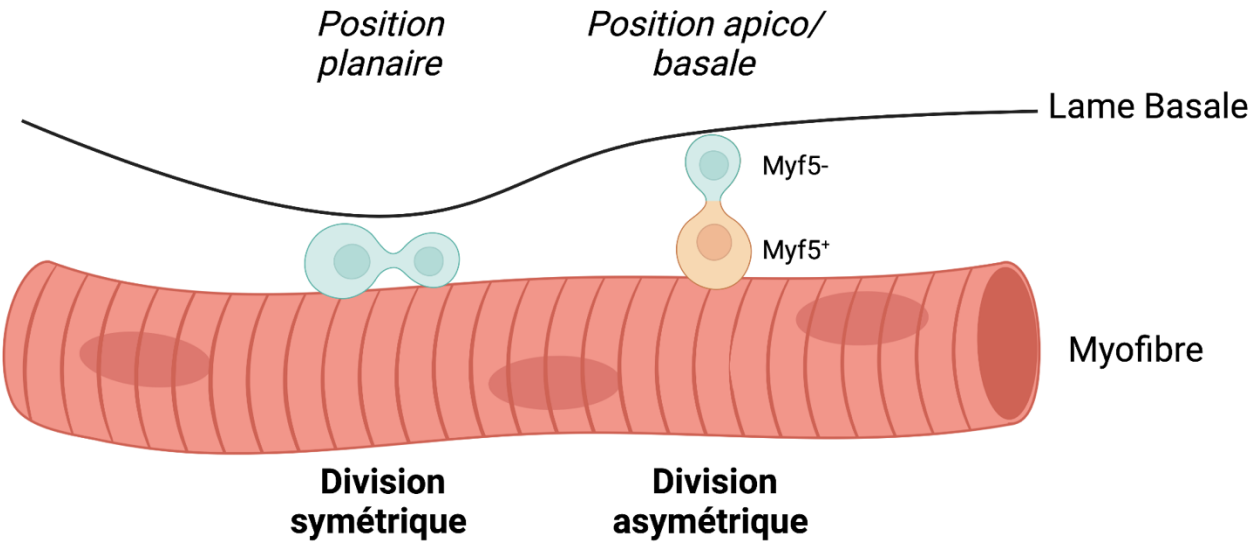


Figure 6 : La division asymétrique et symétrique des cellules satellites.
Lors d'une division symétrique, les cellules satellites sont en position planaire.
Lors d'une division asymétrique, les cellules satellites sont en position apico-basale. La cellule restant attachée à la lame basale est Myf_5^- et celle qui entre dans le programme myogénique est Myf_5^+.

→ La capacité de migration :

L'une des dernières caractéristiques des cellules satellites est leur capacité de migration. En effet, la cellule satellite est capable de réaliser le processus de migration sur quelques millimètres vers le site de lésion. Cette fonction n'est possible seulement qu'après l'activation de la cellule satellite, suite à une blessure ou une agression musculaire.

La cellule au sein de la niche est immobilisée. Afin de réaliser cette migration, la cellule va devoir se détacher. Ainsi, ces cellules activées sécrètent des métalloprotéases (= MMPs) pour dégrader la matrice-extracellulaire et réaliser le processus de migration. Parmi ces MMPs, on retrouve la MMP-1 qui dégrade le collagène I, II, III et les MMP-2/9 qui dégradent le collagène IV[98]. A noter que la fibronectine, le collagène ainsi que la laminine (composants majeurs de la lame basale) sont des protéines essentielles pour la migration de ces cellules[99,100]. De plus, comme dit précédemment, les cellules souches activées expriment la protéine CD34 (= marqueur des cellules souches musculaires) qui jouent un rôle dans la motilité des

cellules vers le site de lésion. En effet, des études montrent que des souris dépourvues de la protéine CD34 voient leurs cellules satellites initier leur migration mais la distance parcourue par les cellules est plus courte (défaut dans la vitesse de migration)[101]. Enfin, la perte de CD44, une autre protéine de surface, conduit à une diminution de la motilité des myoblastes, soulignant l'importance de cette protéine dans ce processus de migration[102].

LA RÉGÉNÉRATION MUSCULAIRE : LA CELLULE SATELLITE

- La capacité de régénération musculaire réside principalement dans les cellules satellites (= cellules souches musculaires).
- Cette population possède différentes capacités intrinsèques :
  - Le maintien d'un état de quiescence
  - La capacité d'auto-renouvèlement grâce à deux types de division : la division asymétrique et la division symétrique
  - La capacité de migration

2. Les différentes phases de la régénération

Comme cité précédemment, la régénération musculaire comprend trois grandes phases dont la phase de régénération et la phase inflammatoire. Bien que les cellules inflammatoires soient les premières arrivées sur le site de lésion, nous détaillerons en premier la phase de régénération impliquant les cellules myogéniques et dans un second temps la phase inflammatoire.

a. La phase régénérative de la régénération musculaire

La deuxième phase de la régénération est appelée la phase régénérative. Elle correspond à une succession de trois étapes contrôlées par des facteurs régulateurs myogéniques (= les MRFs). La première étape correspond à l'activation des cellules satellites quiescentes et à la prolifération des myoblastes. Cette étape est contrôlée par l'expression de MyoD et de Myf_5. La deuxième étape correspond à la phase de différenciation. On voit apparaitre alors l'expression de MRF4, la myogenine et MEF2, permettant la fusion musculaire. Une fois cette fusion musculaire réalisée, les myotubes entrent dans la troisième et dernière phase : la différenciation terminale. Elle permet de passer de myotubes multinucléés à des fibres matures et fonctionnelles

avec l'apparition de l'expression des différentes myosines (MyHC) et de la créatine kinase musculaire (CKM) (**Figure 7**). Dans cette sous-partie, nous allons détailler ces trois étapes.

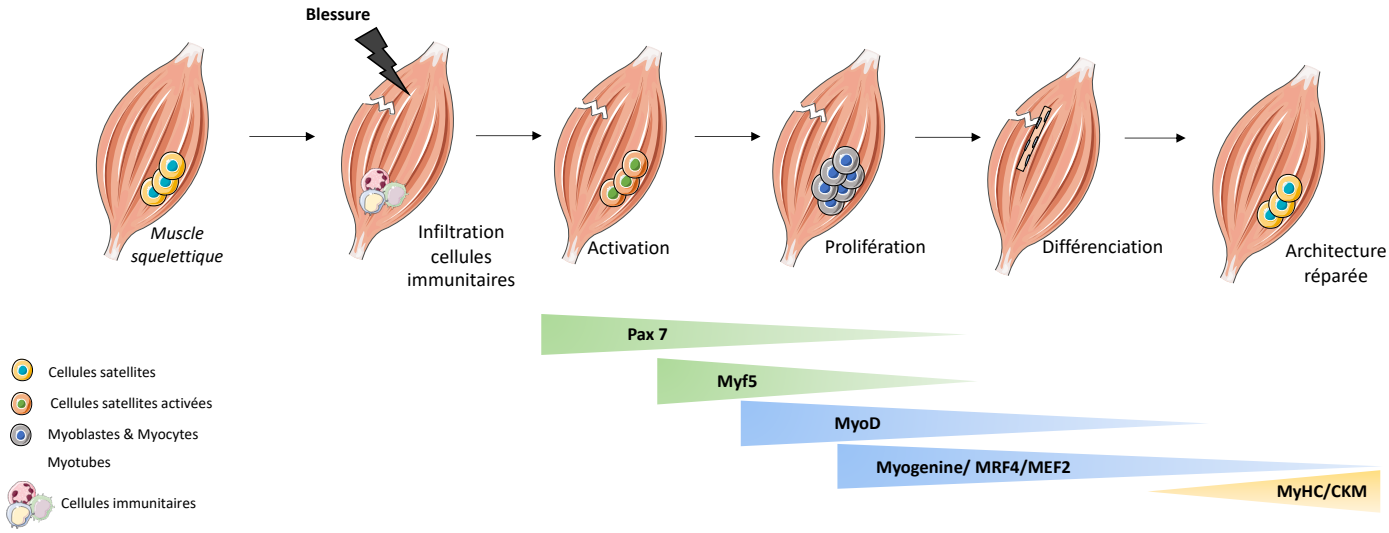


Figure 7 : Expression des différents gènes de la myogenèse pendant les étapes de la phase régénérative

i) L'activation des cellules satellites

Après une blessure, les cellule satellites quiescentes vont être activées par différents signaux et expriment MyoD$^+$ ou Myf$_5^+$.

Le premier signal concerne les facteurs libérés par la matrice extracellulaire (= la MEC) et les cellules endothéliales. En effet, ils sécrètent des facteurs de croissance dont l'IGF1[103], le HGF (= *Hepatocyte Growth Factor*)[104,105], le FGF-2 et le FGF-6 (= *Fibroblast Growth Factor-2/6*) qui vont interagir avec les cellules satellites entrainant leur activation. Par exemple, le FGF2 se fixe sur la cellule satellite *via* le récepteur syndecan-4, présent au niveau de la membrane plasmique provoquant une augmentation transitoire de calcium intracellulaire *via* TRPC (= *transient receptor potential cation channels*). Le facteur de transcription NFATC (= *Nuclear factor of activated T-cells*) va alors être transloqué dans le noyau et activer l'expression de gènes responsables de l'activation de la cellule, qui devient MyoD$^+$ (= marqueur des cellules activées et proliférantes)[106]. Une autre étude confirme le rôle de l'axe FGF-2/Syndecan-4 dans cette première étape et démontre que l'absence de la protéine Syndecan 4 induit un défaut dans l'activation des cellules satellites ainsi qu'une

altération dans les processus de régénération, indiquant son rôle essentiel dans cette étape[107]. Par ailleurs, dans la famille des FGFs, le FGF-6 est surexprimé dans les muscles au cours de la régénération. Des souris mutantes pour FGF6 ($FGF6^{-/-}$) présentent une altération des capacités de régénération, corrélée à une diminution de la présence des cellules $MyoD^{+}$ et $Myogenine^{+}$[108].

Enfin, les cytokines pro-inflammatoires libérées sur le site de lésion telles que le TNFα permettent également l'activation des cellules satellites. En effet, lors d'une blessure, les myotubes libèrent cette cytokine qui va inhiber les voies impliquées dans le maintien de l'état de quiescence des cellules satellites, conduisant ainsi à leur activation[109].

ii) La prolifération des myoblastes

Lorsque les cellules satellites ont été activées par les différents stimuli, elles vont, *via* leur capacité de migration, atteindre le site de la lésion musculaire. Les cellules satellites vont alors entrer dans le cycle cellulaire afin de proliférer et d'augmenter le *pool* de cellules myogéniques nécessaires à la régénération. La cellule, appelée maintenant un myoblaste, se met à exprimer des marqueurs spécifiques comme la desmine, Myf5, MyoD ou encore PCNA (= *proliferating cell nuclear antigen*)[110]. De la même manière que pour l'activation des cellules satellites, les cellules endothéliales et la MEC vont libérer des facteurs comme le VEGF qui vont favoriser la croissance et la prolifération des myoblastes[111]. Nous avons présenté CD34 comme une protéine membranaire participant à la migration mais cette protéine permet également d'initier le processus de prolifération. En effet, chez les souris déficientes pour cette protéine, on observe une diminution de l'incorporation de BrdU après une blessure à la neurotoxine (= NTX) associée à une diminution des cellules entrées dans le cycle cellulaire. Enfin, dans cette étude, les cellules expriment moins le facteur MyoD[101]. Toutes ces perturbations conduisent à une moins bonne régénération musculaire chez ces souris.

iii) La différenciation :

Après plusieurs cycles de prolifération et une fois que le nombre de cellules myogéniques est suffisant, ces cellules quittent le cycle cellulaire et commencent alors

à se différencier. Cette étape est primordiale pour le bon déroulé de la régénération musculaire. Elle est gouvernée par des facteurs régulateurs myogéniques. Ce sont des facteurs faisant partie de la famille des facteurs de transcription spécifiques à hélice-boucle-hélice basique dont fait partie MyoD et Myogenine. Ils vont coopérer avec les membres de la famille des MRF2 dans l'activation de différents gènes spécifiques de la différenciation tardive comme la créatine kinase ou la myosine à chaine légère.

En plus du rôle des CDKi dans le maintien d'un état de quiescence, ces protéines, dont fait partie p21 (= inhibiteur de la CyclinD1), vont être exprimées afin d'initier la différenciation musculaire et permettre à la cellule de sortir du cycle cellulaire. La cellule va alors, dans un premier temps, produire des facteurs myogéniques, puis dans un second temps, des protéines permettant la contractilité comme la myosine, la CKM, l'α-actinine et la troponine. De plus, l'expression de cette CDKi p21 permet de stabiliser et d'accumuler le facteur MyoD[112] et ainsi d'activer l'expression des gènes cibles comme de la créatine kinase, essentiels à la différenciation[113]. La stabilisation et activation du facteur myogénique MyoD est également faite pas la voie Calceurine/MEF2C. Cette voie est activée par l'augmentation de calcium retrouvée dans un cas de régénération musculaire[114].

iv) <u>La fusion :</u>

Enfin, une des dernières étapes importantes est la fusion des myoblastes. Cette étape comprend i) la reconnaissance des cellules entre elles, ii) l'adhésion des cellules, iii) la réorganisation du cytosquelette et iv) la fusion des membranes. Il existe deux types de fusion : la fusion précoce, comprenant la fusion de cellule à cellule et la fusion tardive, correspondant à la fusion avec des myotubes naissants. Cette fusion est permise grâce à plusieurs protéines donc *myomarker* et *myomixer*. Une absence d'une de ces protéines induit une régénération incomplète associé à des défauts de fusion des myotubes (=cellules mononucléées), sans altération de l'expression des gènes de la différenciation[115,116].

b. La phase inflammatoire de la régénération musculaire

La phase inflammatoire de la régénération musculaire est caractérisée et reconnue par la présence de cellules inflammatoires. Cette réponse est indispensable à la régénération. En effet, un défaut de cette réponse, comme par exemple l'absence de l'infiltration du muscle par les macrophages, induit une altération des processus régénératifs associée à une régénération dite incomplète[117].

Cette phase inflammatoire est régie par une cinétique très précise en termes d'infiltration du muscle par les différentes cellules inflammatoires. Brièvement, la première vague cellulaire correspond aux neutrophiles (un jour après la blessure), suivis des macrophages de type M1 (à partir du deuxième jour) pour finir enfin avec les macrophages de type M2 (apparition entre 4-7 jours après la blessure)[118]. D'autres cellules inflammatoires pénètrent également dans le muscle lésé et impactent la régénération tels que les lymphocytes T CD8, les lymphocytes régulateurs, ou encore les éosinophiles. Cependant, ce manuscrit de thèse se concentre essentiellement sur les neutrophiles et les macrophages, étant donné que ce sont les premières cellules à arriver sur le site de lésion. Nous allons détailler dans cette sous-partie, la cinétique d'apparition de ces différentes populations et le rôle de chaque population cellulaire inflammatoire dans le processus de régénération musculaire.

Lors d'une lésion musculaire, la première phase correspond au nettoyage de la zone lésée et des fibres nécrotiques. Pour cela, le premier senseur est le système du complément[119]. Quelques secondes après la lésion, ce système s'active au contact des fibres nécrosées et permet, en partie, l'infiltration de cellules immunes telles que les macrophages et les neutrophiles. Les mastocytes et les neutrophiles résidents, quant à eux, s'activent également, dégranulent et sécrètent des cytokines pro-inflammatoires[120] comme le TNFα (=Tumor Necrosis Factorα), l'IL-1 (= l'interleukine-1), l'IFNγ (=l'interféron-γ) ainsi que des chimiokines tel que le CCL2 (= Monocyte Chemokine Protein 1 (MCP_1)) et le CXCL1[121]. Ces chimiokines vont alors permettre, dans un premier temps, l'extravasion des neutrophiles ($CD11b^{high}/Ly6G^{+}/F4/80^{-}$) présents dans la circulation générale vers le site de lésion. La présence de ces cellules, dont l'infiltration est rapide[122] (apparition vers 2 heures après la blessure avec un nombre maximal à 6-24 heures), est obligatoire puisque une souris dépourvue de neutrophiles voit sa régénération ralentie au cours d'une blessure musculaire[123]. Ces

cellules permettent la clairance des débris des fibres musculaires nécrotiques en libérant des radicaux libres de l'oxygène, des cytokines ou encore des protéases[124]. Parmi les cytokines sécrétées, on retrouve des cytokines pro-inflammatoires telles que le TNFα ou l'IFNγ[125], l'IL-1 et l'IL-8 (= l'interleukine-8)[126]. Ces cytokines libérées par les neutrophiles, associées à l'axe CCR2/CCL2, vont induire une entrée des monocytes circulants ($CCR2^{+}/Ly6G^{+}/CX_3CR_{1}^{low}$)[127] sur le site de lésion. Il semble important de noter que la deuxième population de monocytes circulants[128], caractérisée par les cellules $CCR2^{-}/Ly6G^{-}/CX_3CR_1^{high}$, ne peut s'infiltrer dans le muscle lésé et reste dans la circulation générale. La chimio-attraction de ces cellules par le biais de cet axe est primordiale pour la régénération puisque chez des souris dépourvues du récepteur CCR2[129] ou de la chimiokine CCL2[130,131,132], le recrutement des cellules immunitaires est retardé, entrainant un défaut de régénération. Il existe également deux autres voies, moins importantes, pour cette chimio-attraction : i) *via* l'axe de l'activateur du plasminogène de type urokinase (uPA)[133] et ii) *via* l'axe de la chimiokine CXCL16[134].

L'arrivée en masse des macrophages, cellules de l'immunité adaptative, marque donc la deuxième étape. Parmi cette population cellulaire, il est connu aujourd'hui qu'il existe deux phénotypes de macrophages, possédant des rôles bien distincts : les macrophages de type I (= M1) et les macrophages de type II (= M2). Ces deux types cellulaires ont des rôles bien définis dans la régénération musculaire et n'apparaissent pas au même moment. Plus en détail, une fois que les macrophages $Ly6C^{+}$ arrivent sur le site, les différentes cytokines pro-inflammatoires présentes, en particulier le TNFα et l'IFNγ, vont permettre leur activation vers un phénotype pro-inflammatoire M1[127], *via* la voie STAT1[135]. Ces macrophages sont caractérisés par différents marqueurs tel que $Ly6C^{+}$, $CD68^{+}$, $IL12^{high}$, $IL10^{low}$, $CD163^{-}$. Deux jours après la blessure, le nombre de ces macrophages est maximal. Ils vont prédominer pendant les phases précoces de la régénération et permettre de nettoyer la zone lésée, en association avec les neutrophiles et en sécrétant différentes molécules comme le monoxyde d'azote (=NO). Le NO permet d'induire l'apoptose des débris cellulaires. Cette libération de NO a un double rôle dans la régénération musculaire puisque suivant sa concentration, il peut soit infliger des dégâts aux cellules impliquées dans la régénération (comme les macrophages ou les myoblastes présents), soit les protéger des dommages oxydatifs[136].

Une fois que le nombre de myoblastes est maximal et que le site de lésion est nettoyé, une transition vers les phases tardives de la régénération s'opère. Dans ce cadre, il est important de freiner la réponse inflammatoire puisqu'une forte présence de macrophages et neutrophiles[137] ou des molécules libérées par ces cellules comme le NO à ce stade peuvent induire des dommages tissulaires[138]. Pour cela, les cellules inflammatoires laissent place aux cellules ayant un phénotype anti-inflammatoire. Cette transition marque le début de la troisième phase.

Entre le 4^{ième} et 7^{ième} jours après la blessure, les macrophages de type I vont être remplacés par les macrophages de type II ($Ly6C^{-}/CX_3CR_1^{high}/CD68^{-}/IL12^{low}$, $IL10^{high}/CD163^{+}$). Dû à l'expression importante d'effecteurs anti-inflammatoires tels que le TGFβ_1 (= Transforming Growth Factor β_1) et de l'IL-10 (= interleukine-10), ils sont caractérisés comme des macrophages anti-inflammatoires. Ce « *shift* » de macrophages est important pour la régénération musculaire, puisqu'une absence de cette population à un temps donné induit un ralentissement de la régénération[127,139]. Cependant, certaines études soumettent l'hypothèse que cette absence de régénération dans ces études est dû, en partie, à l'absence de macrophages de type M1, délétés en même temps que les macrophages de type M2.

Plusieurs mécanismes sont à l'origine de ce « *shift* » de macrophages : i) la phagocytose, ii) les molécules libérées et iii) les voies activées. Concernant les fonctions cellulaires, la phagocytose réalisée par ces macrophages peut contrôler cette transition de phénotype. Brièvement, après phagocytose d'une fibre lésée ou d'un neutrophile apoptotique, le macrophage va se mettre à diminuer l'expression des cytokines pro-inflammatoires (comme le TNFα, IL1β) et à exprimer les cytokines anti-inflammatoires tel que le TGFβ. La liaison entre le macrophage et la cellule apoptotique permet donc le changement de phénotype des macrophages et a donc des propriétés anti-inflammatoires[127,140]. A *contrario*, si le macrophage phagocyte un neutrophile lysé, le changement de sécrétion ne s'opère pas et son phénotype reste pro-inflammatoire[141]. Pour ce qui est des molécules libérées, un rôle de l'IGF_1[142] mais aussi de l'IL-10 ont été énoncés. L'IL-10 inhibe l'activation et la cytotoxicité des macrophages M1[143], permettant l'arrivée des macrophages M2 exprimant le CD163[144]. Une autre étude confirme son rôle sur les macrophages M1 puisque des souris déficientes pour cette cytokine présentent une expression de certaines cytokines pro-inflammatoires, reflet du phénotype des macrophages M1, augmentée avec une

diminution de l'expression des marqueurs des macrophages M2 (comme le CD163 et Arginase 1). Cette observation témoigne de son rôle important dans le changement de phénotype des macrophages observé au cours de la régénération[145].

Enfin, lors de ce « *shift* » macrophagique, certaines voies de signalisation sont activées. C'est notamment le cas pour la voie de l'AMPK qui permet de supprimer les réponses pro-inflammatoires (observées par la diminution de la production des cytokines IL-6 et TNFα) et favorise la polarisation des macrophages vers un phénotype anti-inflammatoire. En absence de cette protéine, on n'observe aucun changement phénotypique de macrophages[146,147].

Comme les macrophages M1, les macrophages M2 vont avoir différents rôles lors des phases inflammatoires qui précèdent la régénération du muscle lésé. En effet, ils libèrent des cytokines anti-inflammatoires telles que l'IL-10, l'IL-14 (= interleukine-14) et l'IL-13 (= interleukine 13) qui vont inhiber la réponse inflammatoire au niveau local. De plus, les récepteurs présents sur le macrophage M2, CD163 et CD206, jouent un rôle dans la régénération musculaire elle-même. En effet, le récepteur CD163, exprimé de manière spécifique sur les macrophages de type M2 permet de faciliter la régénération musculaire. Ainsi, lors du processus de régénération, l'hémolyse au sein des tissus lésés induit une augmentation locale et toxique de l'hémoglobine. Si elle n'est pas prise en charge, elle peut accentuer les dommages tissulaires. Le récepteur CD163 permet de fixer cette hémoglobine et de la dégrader[148]. Ce récepteur permet donc de limiter les dommages tissulaires créés lors des processus de régénération et a donc un rôle anti-inflammatoire[149]. Le deuxième marqueur des M2, le récepteur CD206 (=récepteur au mannose), quant à lui, participe au retour à l'homéostasie tissulaire. En effet, les cytokines anti-inflammatoires présentes sur le site vont permettre une meilleure expression de ce récepteur par les M2, entrainant une sécrétion de cytokines anti-inflammatoires qui désactivent rapidement les cellules pro-inflammatoires.

De manière générale, il est important de souligner que la régénération est un processus extrêmement coordonné. Si une étape est manquante, mal réalisée ou peu contrôlée, que ce soit une étape pro-inflammatoire ou anti-inflammatoire, la régénération se voit altérée ou même manquante.

c. Interactions entre les cellules myogéniques et les cellules immunitaires

Les deux types cellulaires majeures qui régissent la phase myogénique et la phase inflammatoire communiquent entre elles (**Figure 8**). En effet, *via* leurs sécrétions, les cellules immunitaires sont capables de diriger et d'influencer le devenir et les fonctions des cellules myogéniques. La présence des deux types de macrophages est couplée à différentes étapes des cellules myogéniques : l'activation, la prolifération et la différenciation musculaire.

De manière générale, dans les années 1990, plusieurs études utilisant des cocultures de macrophages et de progéniteurs myogéniques ou *via* des traitements par des milieux conditionnés obtenus à partir de macrophages décrivent un rôle mitogène des macrophages sur la prolifération des myoblastes et un rôle plutôt inhibiteur sur la différenciation[150,151]. Ces effets sont médiés, souvent, par différents facteurs solubles libérés par les macrophages. Pour citer un exemple, un article montre que les facteurs de croissance libérés par les macrophages ou les monocytes activés stimulent la production et la libération de l'interleukine-6 (= IL-6) par les myoblastes, qui, *via* un rôle autocrine, active leur prolifération[152]. De plus, une étude démontre que les macrophages vont libérer des signaux anti-apoptotiques permettant la survie des myoblastes et des myotubes naissants[153].

Les macrophages M1 sont associés aux myoblastes en prolifération alors que les macrophages M2, macrophages anti-inflammatoires, sont couplés au phases de différenciation[154]. Nous allons maintenant voir plus en détail le rôle de chaque phénotype au niveau des cellules myogéniques.

Comme cité ci-dessus, les macrophages avec un profil pro-inflammatoire libèrent différentes molécules qui agissent sur les cellules myogéniques en tant que support de la prolifération, en réduisant également certains marqueurs de fusion musculaire[127]. Parmi ces différents facteurs, on retrouve le NO, ii) l'IFNγ, iii) le TNFα et iv) l'IL-6. Le NO va activer directement la prolifération des myoblastes[155]. En plus de sa capacité à activer les macrophages vers un phénotype M1, l'IFNγ possède un rôle direct sur les cellules myogéniques. En effet, en 2008, une étude démontre son rôle sur les cellules musculaires ainsi que son rôle pendant la régénération musculaire grâce à des modèles *in vivo* et *in vitro*. Les muscles lésés ainsi que les C2C12 (=

lignée cellulaire musculaire murine) expriment cette cytokine et son récepteur. L'inhibition de la réponse à l'IFNγ, *via* différentes méthodes, induit un défaut de régénération associé à une altération de l'accumulation des cellules immunitaires, de la prolifération et de la fusion musculaire[125]. En somme, cette cytokine se lie sur les cellules musculaires et, induit l'expression de CIITA (= class II transactivator) *via* la voie JAK1/STAT1. CIITA va interagir avec les promoteurs proximaux des gènes spécifiques du muscle (tels que la myogenine), sans se lier directement à l'ADN, afin d'inhiber la différenciation musculaire[156]. Cependant, une expression prolongée dans le temps de l'IFNγ peut nuire à la régénération.

Le TNFα est une autre cytokine sécrétée par les cellules inflammatoires impactant directement les cellules souches musculaires. Son action est très complexe dans la littérature puisque certains articles décrivent un rôle activateur des phases prolifératives[157] et inhibiteur des phases de différenciation[158], alors que d'autres soulignent une initiation de la différenciation musculaire. Ce double rôle peut être expliqué par des variations de concentration de cette cytokine[154]. De manière plus précise, le TNFα, dont le récepteur est présent sur les cellules myogéniques, permet une migration des cellules souches sur le site de lésion *via* une action de chimio-attraction et une hausse de l'activité des MMPs[159]. Il favorise également la prolifération des myoblastes en permettant l'expression de la CyclinD1[160]. Cependant, cette cytokine peut également jouer un rôle sur la fusion musculaire dans les phases plus tardives de la régénération. En effet, *via* la voie p38-MAPK, elle peut activer la différenciation musculaire[161]. Enfin, l'augmentation de TWEAK, cytokine pro-inflammatoire sécrétée faisant partie de la famille du TNF libérée en grande partie par les macrophages, permet la prolifération des myoblastes et des cellules endothéliales et inhibe la différenciation musculaire lors d'une régénération musculaire[162,163].

Pour terminer, l'IL6, libérée après activation de la voie NF-κB dans les macrophages mais également par les cellules myogéniques[164], active la prolifération des myoblastes, *via* la protéine STAT3 et l'expression de la CyclinD1[165,166] et inhibe la formation de myotubes[154]. Cependant, de la même manière que le TNFα, son rôle est plus complexe dans la régénération musculaire. Vers les stades plus tardifs, elle permet l'expression de la myogenine et participe au passage d'une stade prolifératif vers un stade de différenciation.

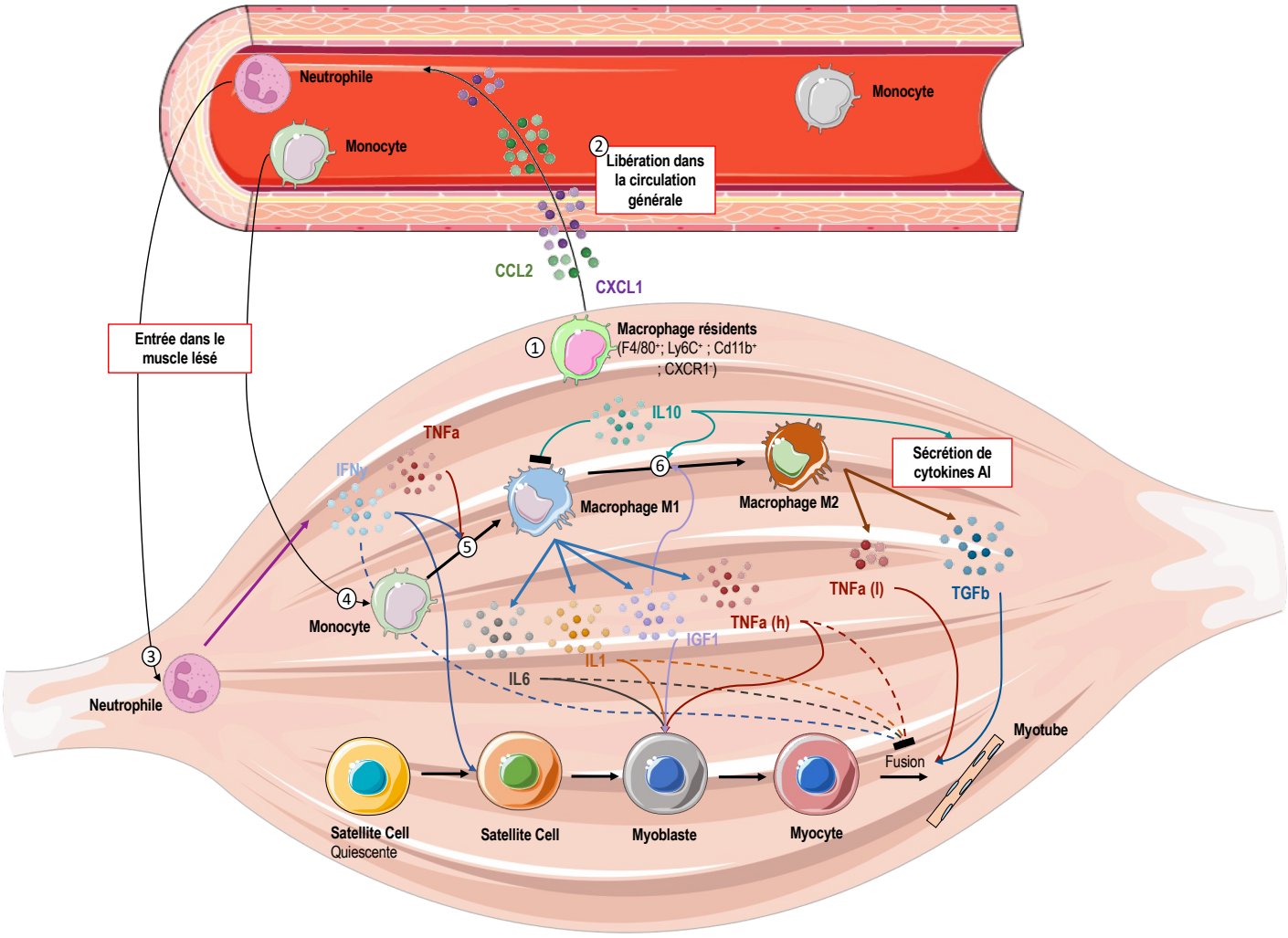
Parallèlement à cela, les macrophages peuvent aussi sécréter des hormones, en plus des cytokines pro-inflammatoires détaillées ci-dessus. Pour citer un exemple, la libération de l'IGF-1 permet d'améliorer la réparation musculaire[167].

De manière générale, le macrophage de phénotype M1 permet une prolifération myoblastique, une inhibition de la fusion musculaire et affecte le passage des cellules d'un stade prolifératif vers un stade de différenciation tardive.

De la même manière que pour les macrophages de type M1, les macrophages de type M2 ont aussi un rôle sur le programme myogénique des cellules musculaires. Ces cellules sont décrites dans la littérature comme pro-myogéniques puisque *via* leurs sécrétions, elles vont influencer la prolifération et la différenciation des cellules myogéniques. Pour exemple, l'IL-10, présente lors du « *shift* » des macrophages de type M1 en M2, agit sur la prolifération des myoblastes. Il a été observé que chez des souris déficientes pour cette cytokine, les cellules expriment plus de myogenine. Cependant, une coculture entre des myoblastes et des macrophages M2 n'induit pas d'augmentation de l'expression de cette protéine. Les auteurs en ont déduit que l'augmentation de la myogenine observée chez ces souris déficientes était le reflet de la capacité des macrophages de type M2 à maintenir les myoblastes dans un état prolifératif et à inhiber l'entrée dans le stade post-mitotique[145].

La transition du phénotype de macrophage M1 vers celui de type M2 se déroule en parallèle de la transition des stades de prolifération vers la différenciation myoblastique[154]. Ainsi, les macrophages de type M2 permettent donc d'activer les dernières phases du processus régénératif. En effet, la modulation de l'inflammation, *via* des facteurs immunosuppresseurs, va permettre de lever l'inhibition sur la différenciation musculaire et permettre de poursuivre les étapes de la myogenèse afin d'avoir une régénération complète. De plus, une étude a montré qu'un traitement avec des cytokines induisant une différenciation des macrophages en macrophages de type M2, comme l'IL-4, réduisait la prolifération des myoblastes et induisait une différenciation, visible par l'expression de la myogénine et la formation de myotubes[127].

Comme dit précédemment, TWEAK permet d'inhiber la différenciation musculaire. Lors des phases tardives suite à une blessure musculaire, la partie extracellulaire de CD163 va être libérée dans le sérum afin d'inhiber TWEAK et ses effets biologiques[168].



① Activation des macrophages résidents.

② Libération des cytokines CCL2 et CXCL1 dans la circulation générale par les macrophages résidents.

③ Arrivé des neutrophiles dans le muscle lésé.

④ Arrivé des monocytes dans le muscle lésé.

⑤ Activation de ces macrophages → M1 phénotype.

⑥ Transition des macrophages M1 en macrophages M2

Figure 8 : Les différentes étapes de la phase inflammatoire de la régénération musculaire et les communications existantes avec les cellules myogéniques.

.

Neutrophile
(Ly6G+ ; Cd11b^{high})

Monocyte
(Ly6C+ ; CCR2+ ; CX3CR1^{low})

Macrophage résidents
(F4/80+; Ly6C+ ; Cd11b+ ; CXCR1-)

Macrophage M1
Pro-inflammatoire
(CD68+ ; CD163-)

Macrophage M2
Anti-inflammatoire
(CD68^{low} ; CD163+)

Monocyte
(Ly6C- ; CCR2- ; CX3CR1^{high})

Satellite Cell
Quiescente
(Pax7+ ; MyoD-)

Satellite Cell
Activée
(Pax7+ ; MyoD+)

Myoblaste
Prolifératif
(Pax7- ; MyoD+)

Myocyte
Post mitotic
(MyoD+ ; MyoG+)

Myotube
Différencié
(MyoD+ ; MyoG+)

3. Les différentes voies impliquées dans les capacités régénératives du muscle squelettique

En plus des sécrétions et des interactions avec les processus inflammatoires détaillées ci-dessus, différentes voies impactent les cellules myogéniques dans les phases de la régénération musculaire (**Figure 9**).

a. La voie NOTCH : rôle majeur dans les premières étapes de la régénération

La voie NOTCH est une voie hautement conservée entre les espèces. Chez les mammifères, il existe 4 récepteurs NOTCH et 5 ligands (Jaggled 1 et 2, Delta 1, 3 et 4). Cette voie est cruciale pour le développement mais est également réactivée en cas de régénération musculaire. Un défaut d'activation/expansion de cette voie entraine des altérations dans ce processus. Cette voie est impliquée à différents niveaux tels que la quiescence, l'auto-renouvellement et la prolifération des cellules myogéniques, que nous allons détailler dans cette sous-partie.

Tout d'abord, alors que le ligand Delta 1 (Δ_1) est exprimé dans les progéniteurs myoblastiques, le récepteur $NOTCH_3$ est exprimé dans les cellules souches ($Pax_7^+/Myf5^-$)[86]. L'activation de cette voie dans ces cellules permet, grâce à différents intermédiaires, d'activer la transcription de certains gènes cibles comme Hes1, Hey1, Hey2 et heyL, impliqués dans le maintien d'un état de quiescence des cellules satellites et essentiels pour la génération de la réserve de ces cellules[86,169,170,171]. De plus, Syndecan-3 a été identifié comme un partenaire essentiel pour activer cette voie. Cette protéine est impliquée dans la régulation du clivage sur le site S2 (en extracellulaire) de NOTCH, médiée par ADAM17/TACE[172]. Un défaut de cette protéine va induire une altération d'activation de la voie avec une sortie de l'état de quiescence pour se diriger vers le cycle cellulaire, associée à un manque d'auto-renouvèlement.

Cette voie est également impliquée dans la capacité d'auto-renouvèlement. En effet, l'asymétrie de l'expression du ligand Δ_1 dans les cellules filles lors de la division pourrait induire un maintien du *pool* de cellules souches. De plus, la cellule qui entre dans le programme myogénique se met à exprimer la protéine inhibitrice de la voie NOTCH : Numb. Elle a été décrite comme déterminante pour le destin de ces cellules. En effet, l'asymétrie de son expression, observée lors de la ségrégation des deux cellules filles, va inhiber la voie de signalisation NOTCH, permettant une entrée dans

le programme myogénique. On peut donc conclure que l'arrêt de la signalisation NOTCH par l'inhibiteur Numb marque la progression des cellules dans le programme myogénique. A l'inverse, l'autre cellule garde une signalisation NOTCH soutenue, par manque d'expression de l'inhibiteur, permettant un maintien de l'état indifférencié. L'asymétrie d'expression de cet inhibiteur permet donc le maintien de l'état de quiescence et l'auto-renouvèlement des cellules[173].

L'activité de NOTCH permet également la prolifération des myoblastes et l'inhibition de la différenciation musculaire. Après une blessure, les cellules expriment le récepteur NOTCH. Cela permet une répression des facteurs myogéniques spécifiques tel que MyoD, Myogenine ou encore MEF2C, entrainant une activation de la prolifération, associée à une inhibition de la différenciation[174]. Ce principe est validé, entre autres, par une étude réalisée par Conboy[173] et une autre réalisée par Brack[175] qui montrent qu'une activation constante et/ou prolongée de NOTCH induit une prolifération des myoblastes, une diminution des marqueurs de différenciation (formation de myotubes, expression de la myosine embryonnaire), associée à un arrêt du processus de myogenèse. De plus, une étude démontre que le domaine intracellulaire de NOTCH contient un signal nucléaire lui permettant de cibler la région hélice-boucle-hélice basique de MyoD afin d'inhiber l'entrée dans le programme myogénique[176].

Il semble important de noter qu'afin de sortir du cycle cellulaire et de s'engager dans la différenciation myogénique, les cellules vont alors ré-exprimer Numb. Cette expression permet d'inhiber la voie NOTCH et d'induire l'expression des différents MRF impliqué dans la différenciation[173].

b. La voie WNT : rôle crucial dans les étapes tardives de la régénération musculaire

Malgré le fait que l'activation de la voie WNT dans un muscle basal reste très controversée dans la littérature de nos jours, plusieurs études ont montré son activation lors d'une blessure musculaire. En effet, après celle-ci, plusieurs ligands (Wnt3a, Wnt5a, Wnt5b, Wnt7a et Wnt7b) sont exprimés dans les myofibres et les cellules satellites et sont impliqués dans la voie canonique et non-canonique WNT.

Concernant la voie non canonique WNT, le ligand Wnt7a ne peut activer que celle-ci dans les myoblastes. Ce ligand peut agir à plusieurs niveaux. Tout d'abord, *via* la voie « polarité cellulaire planaire » (=PCP), la liaison de Wnt7a avec son récepteur Frizzled7 (= fzd7) induit l'auto-renouvèlement des cellules satellites. En effet, cette liaison permet la redistribution de Vangl2 (= effecteur de polarité cellulaire planaire, ayant un rôle crucial dans la voie PCP) aux pôles opposés des cellules satellites en division. Cette redistribution induit une expansion symétrique des cellules satellites, permettant de repeupler le compartiment en cellules souches musculaires[177]. De plus, en coopération avec la fibronectine et le syndécan-4, Wnt7a-Fzd7 permet la prolifération symétrique des cellules satellites indépendantes de Myf5 et un maintien du *pool* des cellules souches musculaires[178]. Enfin, chez les progéniteurs myogéniques, ce ligand Wnt7a facilite la polarisation et la migration cellulaire, médiée par la GTPase Rac1[179].

En outre, ce ligand permet donc d'augmenter le nombre de cellules souches et facilite leur dispersion, ce qui en fait une bonne cible pour une potentiel thérapeutique.

Concernant la voie canonique WNT/β-caténine, son rôle est aujourd'hui très controversé. En effet, certains décrivent une activité de cette voie dans des phases précoces alors que d'autres soulignent son effet dans les phases plus tardives de la myogenèse.

Plus en détails, Otto et ses collaborateurs en 2008 observent que sur des myofibres isolées, la signalisation WNT est exprimée et en fonction du ligand, agit sur la prolifération des myoblastes. Des ligands comme Wnt1, Wnt3a, Wnt5a activent la prolifération myoblastique alors que les ligands Wnt4 ou Wnt6 vont l'inhiber[180]. Cependant, d'autres auteurs démontrent qu'une inhibition de cette voie permet aux cellules d'entrer dans la prolifération. En effet, Parisi et ses collaborateurs ont observé qu'une activité de la protéine APC (= régulateur négatif de la voie canonique WNT permettant son atténuation) permettrait la survie de cellules souches et leur entrée dans le cycle cellulaire[181].

Enfin, des études in *vitro* et in *vivo* ont démontré son rôle dans la différenciation des myoblastes. En effet, nous venons de décrire le rôle important de la voie NOTCH dans la prolifération. Un « *switch »* de cette voie vers une forte expression de la voie WNT est obligatoire et permet d'engager les myoblastes proliférants vers des myocytes dits post-mitotiques (= différenciation des myocytes)[182,175]. Cette

observation est confirmée par d'autres études puisque, en 2004, des travaux montrent que l'expression de la voie canonique WNT (WNT1/β-caténine) en coopération avec l'insuline induit une différenciation des cellules musculaires *in vitro* par activation et recrutement de la réserve myoblastique afin de réaliser la fusion musculaire[183]. De la même manière, une étude montrant que l'inhibition d'une des protéines du complexe cytoplasmique séquestrant la β-caténine, GSK3β, permet une différenciation myogénique confirme ces données[184].

A noter que l'expression des acteurs de la voie WNT doivent être finement régulés afin d'avoir un contrôle de la fonction des progéniteurs pendant la régénération. En effet, une absence de la voie WNT dans les descendants des cellules satellites induit une diminution du potentiel de différenciation myogénique (baisse des cellules Myogénine^{+}, marqueur de différenciation). A l'inverse, si la voie WNT est constitutivement active dans ces cellules ou active dans les phases précoces de la myogenèse, les myoblastes sortent du cycle cellulaire (= marqueur d'arrêt de prolifération) et leur différenciation est dite prématurée[175]. Dans les deux cas, la résultante est un défaut dans la régénération musculaire[185]. Ces études soulignent donc l'importance de la bonne temporalité et des niveaux corrects des acteurs de la voie WNT pour avoir une régénération optimale[185].

Malgré le fait qu'il reste encore des incompréhensions sur l'action de la voie WNT au niveau moléculaire, quelques pistes ont cependant été décrites : i) la β-caténine interagit directement avec des facteurs essentiels de la différenciation musculaire comme MyoD ou encore la Myogenine, renforçant leur liaison aux élément E-box et leur activité transcriptionnelle[186,187], ii) la voie canonique permet, dans les myotubes en différenciation, l'export de $Setdb_1$ diminuant son occupation au niveau de certains *enhancers*, ce qui induit une augmentation des gènes de la différenciation myogénique[188] et enfin iii) le coactivateur de la voie WNT, BCL9, est nécessaire pour la régénération et plus précisément pour la différenciation musculaire, initiée par la voie canonique WNT [189].

c. La voie p38-MAPK : actrice de différentes étapes de la régénération musculaire

La protéine p38-MAPK présente 4 isoformes (α, β, γ et δ). *Via* ces différents isoformes, cette protéine va impacter plusieurs phases de la régénération musculaire telles que l'auto-renouvèlement des cellules souches, la prolifération ou encore la différenciation des myoblastes.

L'une des premières implications de la voie p38α/β MAPK est donc le maintien du *pool* de cellules satellites lors de la division asymétrique (= capacité d'auto-renouvèlement). Une des deux cellules filles va se mettre à exprimer le complexe PAR (composé de PAR3, PAR6, aPKC), qui va phosphoryler la voie p38α/β MAPK et induire l'expression de MyoD. Cette observation est confirmée par plusieurs études qui montrent que la phosphorylation de p38-MAPK permet de phosphoryler MEF2C, activateur de la transcription de MyoD[190,182,191]. Jones et ses collaborateurs appuient cette hypothèse puisque l'absence de phosphorylation de la voie p38-MAPK induit un état de quiescence[191]. La seconde cellule ne va, quant à elle, pas exprimer cette voie. Cela permet de participer à l'auto-renouvèlement lors de cette division, évitant l'épuisement du *pool* de cellules souches.

L'isoforme p38γ-MAPK participe à l'expansion/la prolifération des cellules précurseurs myogéniques. En effet, cette protéine va phosphoryler le facteur myogénique MyoD sur Ser^{199} et Ser^{200}, induisant une liaison accrue de ce facteur sur le promoteur de la myogénine. Cette occupation va induire une diminution de l'activité transcriptionnelle de celui-ci. On peut donc conclure que cette voie permet l'assemblage d'un complexe transcriptionnel répressif de MyoD[192].

Enfin, la voie p38α-MAPK est impliquée dans les processus de différenciation myogénique. Cette voie permet, tout d'abord, d'inhiber la prolifération en antagonisant la voie JNK[193]. De plus, elle va permettre l'expression de la CDKi « p21 », qui comme vu précédemment, permet une sortie du cycle cellulaire[194] mais soutient également l'activation de différents promoteurs essentiels à la différenciation myogénique, dont celui de la myogenine. Cette voie permet la phosphorylation de MEF2A et MEF2C :

deux coactivateurs de MyoD[182], induisant l'activation de la transcription de MyoD, le facteur de détermination myogénique, clé pour la transition prolifération – différenciation. Enfin, comme dit précédemment, la cytokine pro-inflammatoire TNFα peut activer cette voie et initier la différenciation musculaire[161].

d. Le rôle des voies FAK et ERK5 dans la fusion musculaire : dernière étape de la phase régénérative

Comme pour les autres processus mis en place lors de la régénération musculaire, il existe différentes voies qui vont permettre de réaliser la fusion musculaire : la voie FAK et la voie ERK5.

La voie FAK est finement régulée au cours de la myogenèse. En effet, une équipe démontre que la perte de phosphorylation de celle-ci est nécessaire afin d'activer le programme de différenciation des myoblastes et la fusion. L'inhibition de cette perte de phosphorylation conduit à des défauts de différenciation et à une absence presque totale de myotubes. Cependant, ce travail montre également qu'une fois le programme activé, il est nécessaire que cette protéine soit à nouveau phosphorylée pour terminer l'étape de fusion et la différenciation musculaire[195].

L'une des autres voies importantes est la voie ERK5. En effet, en 2001, Sunadone et ses collaborateurs observent que la protéine ERK5 permet, grâce aux facteurs de transcription KIf2 et Kif4, d'impacter la forme des cellules, la motilité, et l'adhésion nécessaires au processus de fusion, indépendamment de l'activation des facteurs myogéniques (MyoD, Myogenine…)[196].

e. Les autres voies impliquées dans le processus de régénération

i) La voie JAK/STAT

L'activation de la voie JAK/STAT1/STAT3 a été montrée comme étant impliquée dans la prolifération des myoblastes. En effet, LIF (= *Leukemia inhibitory factor*) va venir phosphoryler les protéines STAT1 et STAT3[197] et induire une inhibition de la protéine MEF2 (= protéine impliquée dans la différenciation de ces cellules)[198]. De plus, la voie JAK/STAT semble être activée pendant les trois premiers jours suite à

une blessure par une injection de cardiotoxine, correspondant au temps où les cellules satellites du muscle s'activent et prolifèrent[198].

L'inactivation la voie JAK/STATest tout aussi obligatoire pour initier le processus de différenciation[198]. En effet, différentes équipes ont montré que l'inhibition de la voie JAK1-STAT1-STAT3 permet l'expression de facteurs myogéniques tel que MyoD, Myogenine et MEF2. De plus, associée à cette inhibition, l'activation de la voie JAK2-STAT3 spécifiquement dans les cellules satellites permet, suite à une blessure à la cardiotoxine, d'induire les processus de différenciation des cellules myogéniques[199].

ii) La voie NFκB

La protéine NFκB (= nuclear factor-κB) est présente dans le cytoplasme des cellules, sous forme inactive. En effet, la protéine IκBα forme un complexe inhibiteur avec la protéine NFκB. Après un stimuli, la protéine IκB protéase (IKK) va venir phosphoryler cet inhibiteur qui va être ensuite dégradé par le protéasome. Une fois libérée, le facteur NFκB va transloquer dans le noyau et activer la transcription de différents gènes des cytokines, des chimiokines et facteurs de croissance.

Au cours d'une régénération musculaire, les niveaux basaux du facteur NFκB diminuent pendant la différenciation musculaire[200]. *A contrario*, les protéines inhibitrices de ce facteur augmentent, traduisant le potentiel rôle de cette voie dans les processus myogéniques au cours de la régénération.

De ce fait, il a été décrit que l'activation de la voie NFκB se fait à la fois dans les cellules myéloïdes mais également dans les cellules myogéniques. Concernant les cellules myéloïdes, les cytokines pro-inflammatoires IL1 et TNFα induisent une dissociation entre NFκB et son inhibiteur permettant son activation et sa translocation nucléaire dans les macrophages. Cette translocation permet l'activation des gènes codants pour l'enzyme iNOS, le TNFα et l'IL1, alimentant l'inflammation déjà présente[201]. Dans les cellules myogéniques, une fois activée également par le TNFα, NFκB va se lier au promoteur de la CyclinD1 et permettre son activité transcriptionnelle. De ce fait, les cellules vont progresser dans le cycle cellulaire[160] (de la phase G_1 à la phase S) et la différenciation musculaire sera inhibée[158,200,202]. Associé à cette activation de la protéine CyclinD1, NFκB activé induit une déstabilisation de

l'ARNm de MyoD et une dégradation de la protéine[203]. Enfin, l'augmentation de TWEAK, libérée en grande partie par les macrophages, active la voie NF-κB, qui à son tour, active la voie NOTCH. Cette cascade d'activation permet la prolifération des myoblastes et inhibe la différenciation musculaire lors d'une régénération musculaire[162,163].

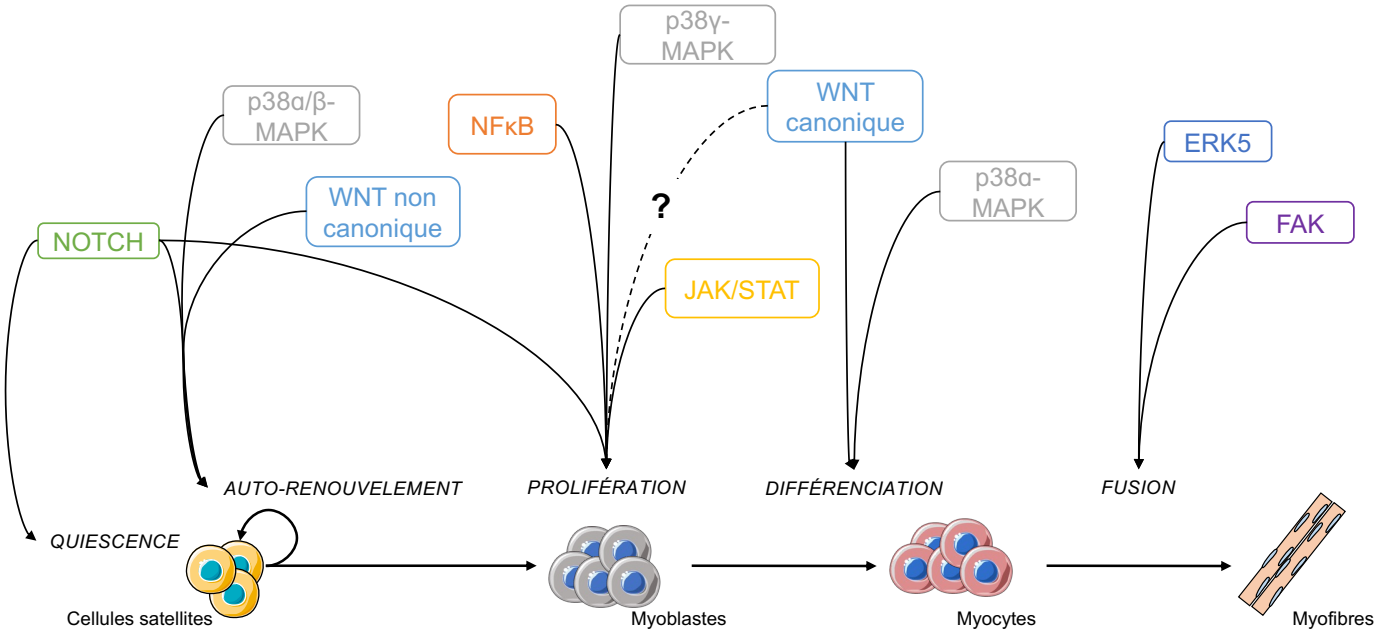


Figure 9 : Les différentes voies cellulaires et leurs impacts sur les différentes phases de la myogenèse, lors d'une régénération musculaire.

LA RÉGÉNÉRATION MUSCULAIRE : LES DIFFÉRENTES PHASES

- La première phase du processus de régénération correspond à la phase inflammatoire, caractérisée par une infiltration des cellules inflammatoires. Elle est essentielle et obligatoire.
- La deuxième phase décrite dans ce manuscrit correspond à la phase régénérative, comprenant l'activation des cellules satellites, la prolifération et la différenciation-fusion des cellules myogéniques.
- Les différentes cellules de ces deux phases communiquent entre elles *via* des sécrétions.
- Plusieurs voies sont impliquées dans ce processus de régénération :
  - La voie NOTCH est impliquée dans la quiescence, l'auto-renouvèlement et la prolifération des cellules myogéniques.
  - La voie WNT est impliquée dans l'auto-renouvèlement, la division symétrique, la migration cellulaire et la différenciation des cellules myogéniques.
  - La voie p38-MAPK est cruciale et impliquée dans l'auto-renouvèlement, la prolifération et la différenciation myogéniques.
  - La voie FAK et ERK5 est impliquée dans la fusion musculaire
  - Autres voies : la voie JAK/STAT et la voie NF-κB.

4. Les autres cellules impliquées dans les processus de régénération

Les cellule souches musculaires et immunitaires sont les principales cellules qui régissent le processus de régénération. Cependant, différentes études ont démontré que d'autres cellules telles que les progéniteurs fibro-adipogéniques (= FAPs), les fibroblastes, les cellules endothéliales et les cellules associées aux vaisseaux sanguins comme les péricytes sont requises pour ce processus. De plus, les interactions entre les différentes cellules sont primordiales. Les cellules endothéliales et les cellules associées aux vaisseaux sanguins ne seront pas détaillées dans ce manuscrit.

Nous allons donc aborder le rôle et les interactions de ces cellules lors du processus de régénération musculaire.

a. Les progéniteurs fibro-adipogéniques

Généralités & caractérisations :

Les progéniteurs fibro-adipogéniques, connus également sous le nom de FAPs, sont des cellules présentes à l'état basal et en cas de blessure dans le muscle squelettique. Elles se situent dans l'espace interstitiel[204], à proximité des vaisseaux. Ces cellules sont multipotentes et sont capables de se différencier en différents types cellulaires : i) en cellules fibroblastiques[205], ii) en cellules adipocytaires[204,205] et en iii) cellules ostéoblastiques/chrondroblastiques[206].

Chez la souris, elles sont caractérisées par différents marqueurs comme $CD45^-$, $\alpha7\text{-integrin}^-$, $CD31^-$, $PDGFR\beta^-$, Sca_1^+, $CD34^+$[207], $PDGFR\alpha^+$, $CD73^+$ et $CD90^+$.

Chez l'homme, ces cellules ont le même phénotype, le même potentiel de différenciation et les mêmes fonctions[208, 209,210]. A noter, cependant, qu'il n'existe pas d'homologue de Sca_1. De ce fait, son absence et la présence des autres marqueurs tel que $PDGFR\alpha$, CD90, CD15 permet d'identifier cette population.

Leurs rôles dans un muscle au repos :

Dans un muscle au repos, ces cellules sont dans un état de quiescence. Ces cellules sont primordiales pour le maintien de la masse musculaire puisqu'une absence de FAP induit un phénotype similaire à celui d'une souris sarcopénique[211,212], à savoir : i) une faiblesse musculaire, ii) une atrophie des muscles associée à iii) une

altération du type de fibres et à iv) une dégénérescence des jonctions neuromusculaires. De plus, lors d'un âge avancé, le nombre de cellules souches musculaires est considérablement diminué[211]. Ces travaux soulignent donc l'importance de ces cellules dans la maintenance du muscle squelettique et du *pool* de cellules souche. Leur action passe, en partie, par la sécrétion de Bmp3b, qui agit sur la voie hypertrophique musculaire $Smad_{1/5/8}$/AKT[212].

Il a été également montré que ces cellules créent un environnement favorable aux cellules myogéniques puisqu'elles expriment des composants de la MEC comme le collagène[213] mais également des cytokines, facteurs de croissance ainsi que d'autres molécules comme la leptine, le GDF10, l'IL-6, l'IL-10 qui favorisent la myogenèse et régulent le réseau de capillaires[214].

Rôle au sein du muscle lors de la régénération musculaire

En plus de leur rôle à l'état basal dans le muscle squelettique, ces cellules ont des actions suite à une blessure. De manière générale, ces cellules ont différents rôles : i) une fois activé après un dommage[205], elles phagocytent les débris cellulaires[215], ii) elles vont sécréter des composants de la MEC afin de créer une structure et iii) elles contribuent à la reconstruction vasculaire[216]. Enfin, elles sont primordiales pour la régénération musculaire puisque leur déplétion entraine une augmentation de la nécrose associée à une diminution de la taille des fibres[211].

Une fois dans le muscle lésé, il est primordial que ces cellules entrent en sénescence[217] ou meurent par apoptose[218] pour le bon déroulé du processus de régénération. Les FAPs peuvent agir sur différents types cellulaires : i) les cellules inflammatoires/immunes, ii) les cellules myogéniques et iii) les cellules résidentes musculaires (**Figure 10**). La dernière interaction ne sera pas décrite dans ce manuscrit de thèse.

i) Sur les cellules inflammatoires/immunes

Le pic inflammatoire coïncide avec le pic des FAPs, supposant l'action des FAPs dans ce processus. Lors des premières phases de la régénération musculaire, les FAPs sont impliquées dans le recrutement des cellules immunitaires, sur le site de lésion puisqu'une déplétion des FAPs lors des processus de régénération induit une baisse de l'accumulation des cellules $CD45^+$ durant les premières phases[211]. De plus,

elles sécrètent également une autre cytokine qui va permettre le recrutement des lymphocytes régulateurs : l'interleukine-33 (= IL-33)[219].

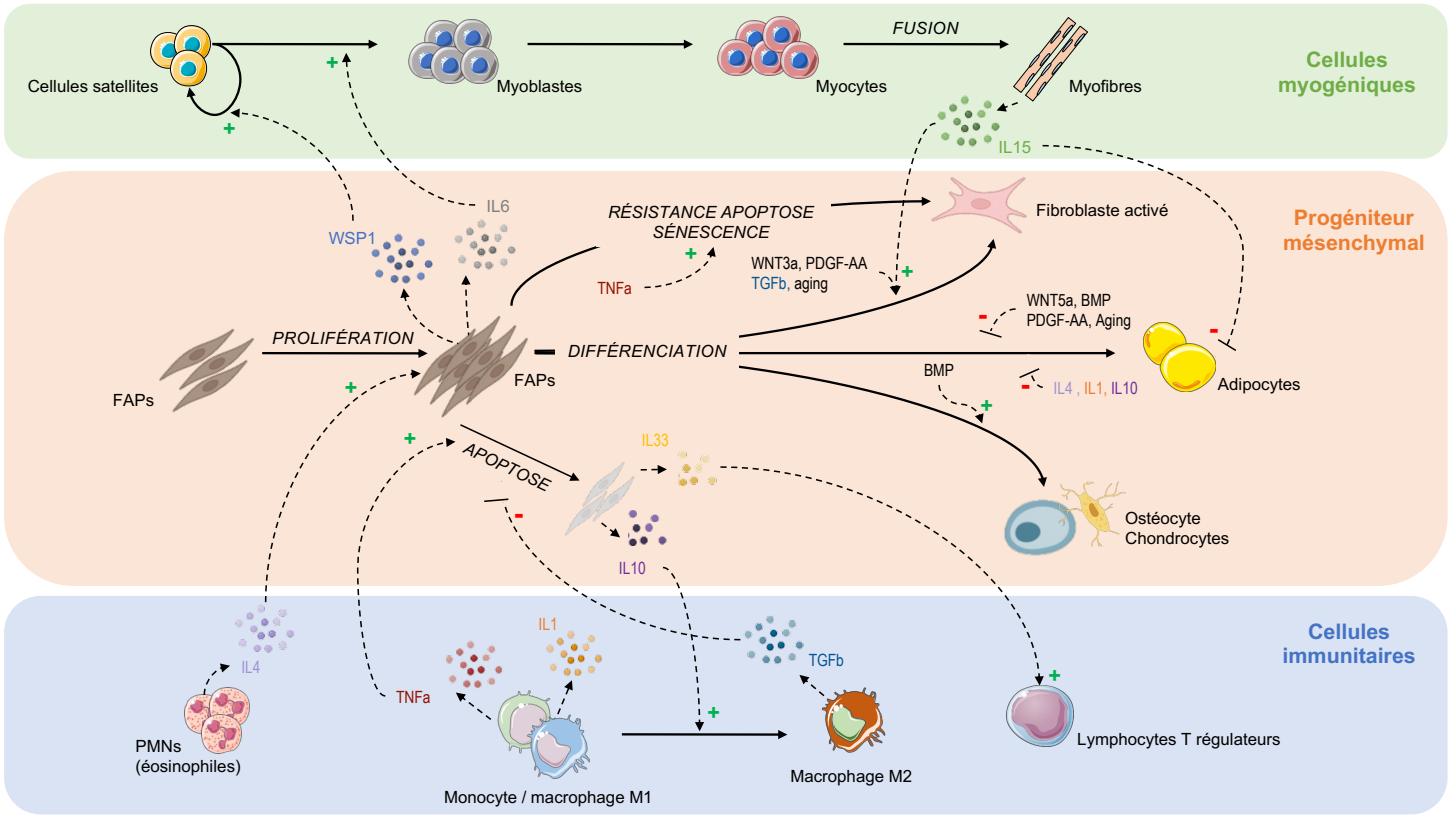
A noter que l'interaction qui existe entre les FAPs et les cellules immunes est bilatérale puisque les cellules inflammatoires peuvent agir sur l'accumulation, l'activation, le destin cellulaire et la clairance des FAPs (**Figure 10**). Voici quelques exemples pour illustrer cette théorie. Les éosinophiles vont sécréter localement de l'interleukine-4 (IL-4), dont le récepteur IL-4Rα est sur les FAPs. Cette cytokine a différentes actions sur ces cellules : i) l'activation de la prolifération des FAPs, ii) l'inhibition de leur différenciation en cellules adipogéniques[220] et iii) l'activation de leur capacité de phagocytose importantes pour nettoyer des débris cellulaires après blessure. En plus des éosinophiles, les sécrétions des macrophages agissent de différentes manières sur les FAPs : i) en inhibant la différenciation adipogénique *via* la sécrétion de l'IL-1β, ii) en bloquant la différenciation fibrogénique et en activant leur apoptose *via* la sécrétion de TNF-α[218] et enfin iii) en favorisant leur survie, leur prolifération et leur différenciation en myofibroblastes et en inhibant celle en adipocytes *via* le facteur TGF-β, libéré par les macrophages anti-inflammatoires[221,222]. A noter que la myostatine a les mêmes effets que le TGF-β[223].

La transition des macrophages pro-inflammatoires vers un phénotype anti-inflammatoire ainsi que leurs sécrétions permettent d'éviter l'accumulation excessive de FAPs, les dépôts de tissu fibrotique et un maintien des réserves cellulaires.

ii) Sur les cellules myogéniques :

Compte tenu de leur proximité avec les myofibres, il existe une communication entre ces deux types cellulaires. L'inhibition de l'expansion des FAPs par le Nilotinib (= une tyrosine kinase inhibitrice avec une activité anti-fibrotique puissante), qui induit une moindre expansion des cellules satellites et à terme un défaut de régénération musculaire[224]. En plus de leur rôle dans le maintien du *pool* de cellules souches, ces cellules peuvent activer la différenciation et la fusion, par augmentation des gènes de la myogenèse tardive (MyoD, Myogenine) et diminution des gènes de la myogenèse dite précoce (Pax_7)[205]. Elles régulent également le type des fibres néosynthétisées[212].

Enfin, les FAPs sont source de différents facteurs qui ont un rôle dans la myogenèse et sur les cellules musculaires : i) l'interleukine-6 qui induit une atrophie et



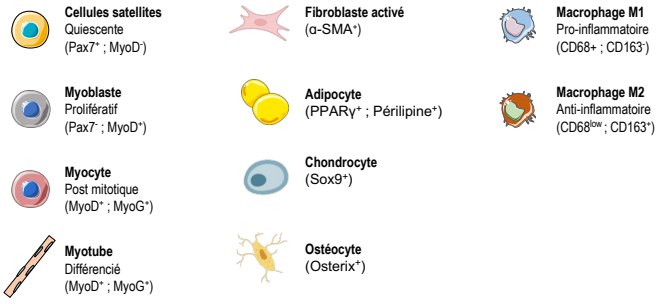


Figure 10 : Interactions entre les FAPs, les cellules immunitaires et les cellules myogéniques.
Via les sécrétions, les différentes populations cellulaires interagissent entre-elles et impactent les différentes fonctions et le devenir des cellules.

b. Les fibroblastes

Enfin, la régénération requiert la présence d'un autre type cellulaire, d'origine mésenchymateuse : les fibroblastes. Les fibroblastes sont des cellules présentes dans tous les organes et servent de soutient. Dans un contexte basal, ces cellules sécrètent, en très faible quantité, un des composants la MEC : le collagène. Au niveau phénotypique, elles sont α-SMA$^-$.

Suite à une blessure ou un traumatisme, le fibroblaste va se différencier en myofibroblaste. A noter qu'un état existe entre ces deux phénotypes : le pro-myofibroblaste (α-SMA$^-$, desmine$^-$), qui peut sécréter du collagène de type I et III. Les

myofibroblastes sont donc des fibroblastes ayant subi des modifications de tensions avec une apparition de fibres de stress. De plus, ces cellules deviennent α-SMA$^+$/vimentine$^+$/desmine$^-$. Leur différence réside également dans leur capacité de contractilité : alors que les fibroblastes sont considérés comme des cellules non contractiles, les myofibroblastes le sont. Il est donc souvent considéré dans la littérature que lors de la régénération ou de la cicatrisation, le myofibroblaste devient la forme « active » des fibroblastes. Des études, souvent réalisées sur la fibrose pulmonaire, ont démontré les sources potentielles des myofibroblastes (**Figure 11**) que sont : i) la différenciation des fibroblastes en réponses à des effecteurs spécifiques, ii) la reprogrammation de cellules CD34$^+$/CD45$^+$/collagène-I$^+$ (= connues également sous le nom de « fibrocyte »), arrivées de la circulation[231] et enfin iii) par dérivés du parenchyme épithélial par le processus de TEM (= transition épithélio-mésenchymateuse)[232]. Certaines populations cellulaires peuvent également sécréter cette matrice extra-cellulaire. C'est le cas des plaquettes sanguines, des cellules satellites[233] et des FAPs, comme cité ci-desuss[205].

Ces cellules sont essentielles à une régénération optimale puisqu'elles permettent une stabilisation du tissu lésé et créent une structure pour les fibres néosynthétisées. L'activité des myofibroblastes est donc essentielle et elle peut être mesurée de différentes manières : i) leur prolifération, ii) leur capacité de migration, iii) leur capacité de contraction et enfin iv) l'expression de marqueurs spécifiques comme la vimentine ou encore l'α-SMA.

La partie sur la régulation de la MEC, son rôle et ses dérégulations seront détaillées dans le chapitre de la fibrose, ci-dessous.

La teneur de cette matrice dans les organes, dont le muscle, est finement régulée par une balance entre la synthèse et la dégradation des composants de la MEC. Deux types d'enzymes permettant de la contrôler : i) les métalloprotéinases matricielles, connues sous le nom de MMP, ayant pour rôle de dégrader cette matrice et les ii) les TIMPs (= *Inhibitors of MetalloProteinases*) qui, elles, vont venir inhiber ces MMPs et permettre sa synthèse. Dans les muscles squelettiques, différentes MMPs sont exprimés en condition basale tel que la MMP-2 (= gélatinase B), la MMP-9 (= gélatinase B) et la MMP-13 (= collagénase interstitielle). Cette balance, finement régulée, est essentielle pour différents processus comme la régénération musculaire

et la cicatrisation puisque l'inhibition des MMPs, par exemple, altère la régénération musculaire et augmente le dépôt de collagène dans le muscle après une blessure[234].

Les myofibroblastes surviennent pendant les premières phases de ce processus et sécrètent, en partie, cette MEC. On voit alors apparaitre une accumulation de différentes protéines comme la fibrine, la fibronectine ou encore le collagène. Cette matrice possède plusieurs rôles lors de ce processus : i) compléter les lésions musculaires, ii) permettre une meilleure migration des différentes cellules, iii) supporter les vaisseaux et les nerfs, iv) recréer une structure transitoire et v) permettre l'activation de différentes cellules dont les cellules immunitaires. Pour exemple, les DAMPs mitochondriaux libérés suite à une blessure vont activer le récepteur TLR9 et le récepteur formyl-peptide 1 des cellules qui vont alors libérer la MMP8, permettant un recrutement massif et une dégranulation des neutrophiles[235]. De plus, certains composants de la MEC peuvent activer les macrophages nécessaires à la régénération musculaire. Le fibrinogène va pouvoir activer les macrophages pro-inflammatoires *via* sa liaison avec le récepteur Mac-1 présent sur ces cellules[236]. A noter que la présence de ces cellules est nécessaire et indispensable pour contrôler la bonne structure de ce tissu. En effet, l'absence de leur infiltration induit une altération des processus myogéniques associée à une fibrose observée avec un dépôt massif de collagène et une forte expression du facteur de croissance du tissu conjonctif[117].

Lors des dernières phases de résolution, afin de retrouver une homéostasie tissulaire, la MEC transitoire va être dégradée par des protéases comme les MMPs et les myofibroblastes meurent par apoptose. Cependant, pour un retour correct à l'homéostasie tissulaire, les fibroblastes restants qui sont dit « résidents » retournent à un état de quiescence et retrouvent leur phénotype non contractile. En plus des MMPs, des TIMPS et de la mort par apoptose des myofibroblastes, l'apoptose des FAPs permet de contrôler ce dépôt de collagène afin de prévenir l'excès de la MEC. Plus en détail, après une blessure, l'infiltration de macrophages inflammatoires, exprimant la protéine TNFα, permet d'induire une mort cellulaire par apoptose des FAPs et d'inhiber leur transformation vers un phénotype fibrogénique. Un défaut de ce processus, comme chez la souris déficiente pour la dystrophine (= souris *mdx*) qui augmente la sécrétion de TGFβ, contrecarrant les effets apoptotiques du TNFα, induit une survie des FAP, puis ensuite un excès de dépôt de collagène conduisant au développement d'une fibrose[218].

Cette matrice peut directement agir sur les myoblastes et influencer leur devenir myogénique. En effet, dans une étude de 2011, le manque de cellules satellites altère la régénération avec une augmentation de la fibrose. A *contrario*, une absence de fibroblastes provenant de ce tissu conjonctif musculaire n'induit pas un arrêt de la régénération mais une différenciation précoce des cellules satellites au détriment de leur expansion, altérant ce processus[237]. De plus, d'autres études ont montré l'importance de cette MEC dans les processus de différenciation des cellules musculaires. Une inhibition des composants de la MEC induit une perte d'expression des marqueurs de la différenciation myogénique tardive tels que la créatine kinase, sans altérer l'expression des facteurs de transcription myogéniques spécifiques (MyoD, MEF2A, Myogenine)[238]. Enfin, en plus du rôle sur la différenciation musculaire, la MEC peut également agir sur la capacité d'auto-renouvèlement des cellules souches musculaires. Ainsi, le collagène IV, composant extracellulaire de la niche des cellules souches musculaires, induit une rigidité optimale qui permet la maintenance du *pool* cellulaire et la survie des cellules satellites après des blessures musculaires[239].

En plus d'un rôle des composants de la MEC sur les différents processus myogéniques des cellules musculaires, les enzymes qui permettent de moduler cette matrice ont une action sur certaines fonctions musculaires comme la migration et la fusion. En effet, il existe de nombreuses MMPs chez la souris qui jouent un rôle mais, pour n'en citer que quelques-unes, i) les MMP1[240], MMP2[241], MMP13[242] améliorent la migration[243] des cellules de la lignée musculaire C2C12 alors que ii) les MMP7, MMP9, MMP14 permettent une meilleure fusion musculaire[240,244]. Enfin iii) les MMP2[245], MMP10[203] jouent un grand rôle dans la régénération musculaire en permettant une modulation des fibres musculaires et une efficacité de ce processus. De plus, certaines MMPs comme la MMP-2, la MMP-3 et la MMP-7, sont capables de digérer des composants de la MEC, comme la Décorine. Cette protéine joue un rôle dans la production de collagène et est un réservoir de la cytokine TGF-β au sein du milieu extra-cellulaire. Une étude montre que la digestion de la décorine par ces trois MMPs permet de libérer cette cytokine[247] qui peut être importante pour la formation de la MEC puisque le TGFβ_1 est un puissant médiateur de la production des protéines majeures de la MEC comme la fibronectine, le collagène de type I ou encore le collagène de type IV[248]. Cette cytokine pro-inflammatoire a différents rôles au sein de la fibrose. Premièrement, une étude démontre que le TGFβ_1 peut induire une transdifférenciation

des myoblastes en myofibroblastes via l'axe SK1/SIP3 et les protéines Smad[249, 250]. Deuxièmement, elle peut également jouer directement un rôle sur les fonctions des cellules myogéniques en induisant une inhibition de la différenciation musculaire, au détriment d'une activation des gènes impliqués dans la fibrose comme celui de la fibronectine[251]. Enfin, cette cytokine permet également l'expression du *connective tissue growth factor* (=CTGF/CCN-2), qui est très impliqué dans l'apparition de la fibrose dans les pathologies associées. Pour exemple, dans la maladie de Duchenne, elle est impliquée dans l'apparition de la fibrose ainsi que dans le phénotype de dystrophie musculaire. Différentes études démontrent qu'une diminution du CTGF chez des souris mdx, avec une approche directe ou indirecte, améliore le phénotype dystrophique des souris, les performances musculaires (endurance, force musculaire par exemple) et diminue l'accumulation de matrice extra-cellulaire[252,253].

Pour terminer sur le rôle des fibroblastes et de la MEC, les cellules immunitaires vont pouvoir moduler cette fibrose musculaire en régulant l'activité des MMPs *via* la libération de différentes cytokines, chimiokines ou autres molécules. Pour exemple, l'hormone IGF-1, libérée en partie par les macrophages et les monocytes, favorise la réparation en inhibant l'apparition de fibrose[167], *via* une inhibition de la voie AKT/Smad. En effet, IGF-1 va permettre de bloquer la voie AKT/Smad impliquée dans la fibrose[251].

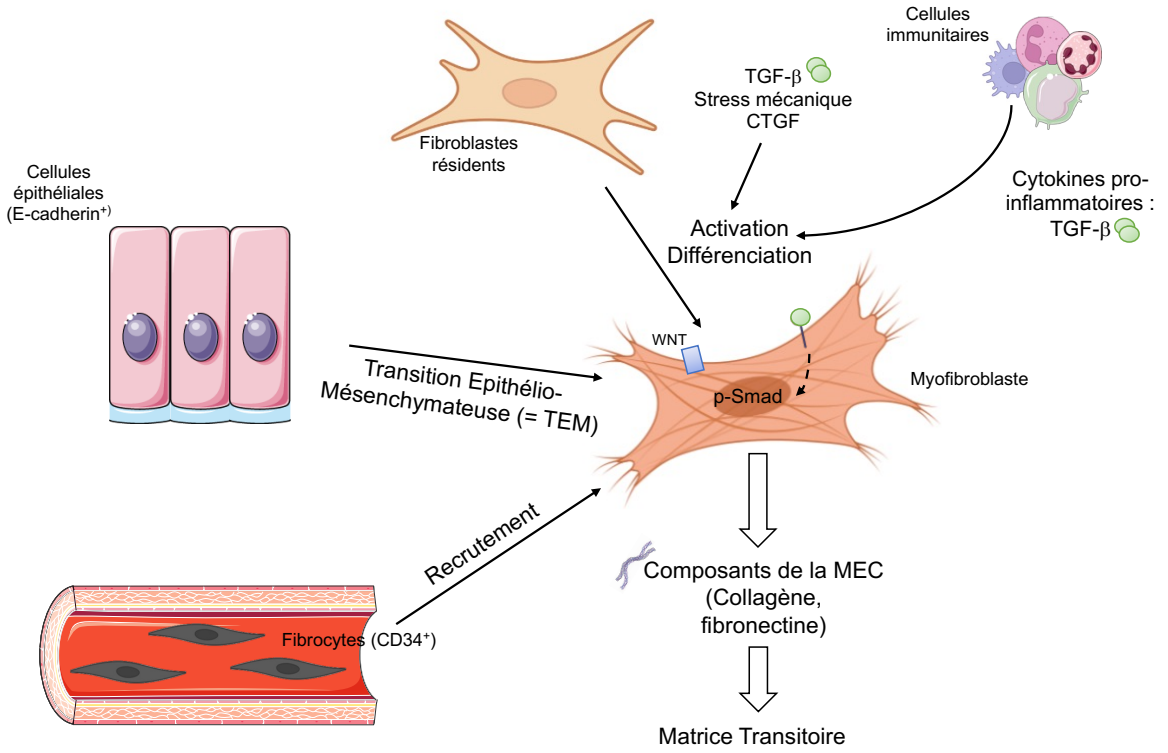


Figure 11 : Les myofibroblastes, cellules responsables de la matrice extra-cellulaire transitoire.
Lors d'une régénération musculaire, différents facteurs dont le TGF-β et le CTGF vont être sécréter afin d'activer et de différencier les fibroblastes en myofibroblastes. Associé à cette différenciation, des fibrocytes vont être recrutés et les cellules épithéliales vont subir la TEM. Une fois les myofibroblastes sur le site de lésion, ils vont sécréter les composants de la MEC afin de créer une matrice dite transitoire.

LA RÉGÉNÉRATION MUSCULAIRE : LES AUTRES CELLULES IMPLIQUÉES

- Les progéniteurs fibro-adipogéniques (= FAP) sont présentes à l'état basal et en cas de blessure musculaire.
  - Ces cellules interagissent avec les cellules inflammatoires et myogéniques.
  - A la fin de la régénération, ces cellules entrent en apoptose ou sénescence afin de revenir à un état homéostasique.

- Les fibroblastes sont des cellules de soutient, présents dans la majeur partie des organes dont le muscle squelettique.
  - Une fois activées, ces cellules se différencient en myofibroblastes.
  - Elles permettent de stabiliser le tissu lésé et créer un échafaudage pour les nouvelles fibres synthétisées.
  - Les myofibroblastes meurent par apoptose et les fibroblastes « résidents » retournent à un état de quiescence.

5. Les dérégulations du processus de régénération liées au vieillissement :

Au cours du vieillissement, le processus de régénération musculaire est altéré, participant à la mise en place de la sarcopénie. Dans cette sous-partie, les différents mécanismes et molécules impliqués vont être cités et expliqués.

a. Les pertes des capacités myogéniques au cours du vieillissement

Bien que controversé dans la littérature, la perte du *pool* de cellules souches semble être l'une des causes principales de la perte de la capacité de régénération observée au cours du vieillissement. Certains travaux chez l'homme mais également chez le rongeur montrent une diminution du nombre de cellules satellites[254,255,256]. Pour exemple, grâce à une construction génique, Day et ses collaborateurs montrent un déclin des cellules satellites avec l'âge sur des myofibres isolées d'EDL de souris âgées. De plus, ils observent une diminution du nombre de clones par cellule satellite (= reflet des capacités à générer un *pool* de cellules souches), expliquant l'épuisement des cellules souches musculaires observé[257]. En parallèle, la cellule satellites provenant d'un sujet âgé est plus susceptible d'entrer en apoptose, expliquant la déplétion de ces cellules musculaires qui peut être observé avec l'âge[258]. Cependant, de nos jours, cette hypothèse n'est pas encore complétement admise dans la communauté scientifique. En effet, d'autres études montrent que le nombre de cellules souches reste inchangé dans le *soleus* des rats âgés ou chez les personnes âgées, indépendamment du sexe[259,260]. Ces divergences proviennent, notamment, du matériel utilisé (souris, humain ou encore rat), du muscle étudié ou encore de la méthode d'analyse. Il existe différentes pistes qui peuvent expliquer ce résultat : un changement du micro-environnement de la niche, des défauts des capacités de quiescence/activation cellulaire ou encore des altérations de la survie cellulaire.

La niche des cellules satellites permet, comme cité ci-dessus, de préserver un état de quiescence (= stade G_0). En effet, *via* différentes protéines libérées ou exprimées, la cellule est capable de maintenir cet état. Cependant au cours du vieillissement, on voit apparaitre des défauts d'expression dans la niche qui induisent un défaut de maintien de cet état de repos. En effet, dans le muscle d'une souris âgée, l'expression de FGF2 issu des myoblastes est augmentée, entrainant une perte du stade de la quiescence et des capacités d'autorenouvèlement. Ces pertes de capacités

entrainent, à terme, une exhaustion du *pool* de cellules satellites[261]. De plus, une étude réalisée par Shea et ses collaborateurs démontre qu'une altération de l'expression de Sprouty-1 induit un défaut dans le processus de retour à l'état de quiescence, sans altération de la prolifération et la différenciation musculaire[91]. L'axe FGF2-Sprouty-1 est donc primordial dans le maintien du *pool* de cellules souches.

La déplétion des cellules satellites observées peut être aussi expliquée par une géro-conversion (= conversion vers un phénotype gériatrique) de ces cellules. En effet, dans les cellules satellites jeunes, le locus INK4a est réprimé par le complexe PRC_1 (complexe formé de RinglBE$_3$ ubiquitine ligase et Bmi_1) permettant une répression de l'expression d'un des marqueurs de la sénescence : p16. Cette répression est observée par la marque H2Aub. Dans les cellules satellites âgées, cette marque répressive sur ce locus est diminuée, induisant une expression de p16. Cette expression bloque le maintien des cellules dans un état de quiescence, dans des conditions basales. De plus, lors d'une blessure, ces cellules échouent à s'activer mais également à s'auto-renouveler pour maintenir le *pool*. Cette surexpression est retrouvée chez l'homme[262]. Cette observation est confirmée par une étude menée par Cosgrove et ses collaborateurs en 2014, où une augmentation de la phosphorylation de la voie p38-MAPK entraine une augmentation des CDKi, tels que p21 et p16[263].

Enfin pour finir sur l'expansion et l'auto-renouvèlement des cellules souches musculaires chez un sujet âgé, certaines voies, impliquées dans ces deux phénomènes sont altérées. En effet, Bernet et ses collaborateurs[264] observent, qu'au cours du vieillissement, la voie p38-MAPK est hyper activée dans les cellules souches, induisant une dérégulation au niveau du processus d'auto-renouvèlement : les deux cellules filles vont alors exprimer MyoD et être engagées dans la myogenèse. De ce fait, au fur et à mesure des besoins en cellules souches lors des différentes blessures, le *pool* de ces cellules va diminuer.

Le nombre de cellules souches musculaires n'est pas la seule dérégulation que l'on peut observer au cours du vieillissement. En effet, on voit également apparaitre des défauts dans les fonctions de ces cellules comme le devenir myogénique (prolifération, différenciation myogénique). Plusieurs études montrent un défaut d'expression des marqueurs de la différenciation (MyHC, la créatine kinase musculaire, la myogenine, p27 et $FoxO_1$, protéines essentielles à la différenciation) ainsi que de la fusion, (moins de myonucléi et une altération de la morphologie). Ces

altérations sont le reflet d'un défaut de différenciation musculaire, expliquant le manque des capacités régénératives observé chez le sujet âgé[265]. De plus, le profil d'expression de MyoD et de la Myogenine est prolongé dans le temps chez le rat au cours du vieillissement, expliquant également les défauts observés[266,267].

Comme cité dans la partie inflammation, CCR2 est primordial pour la réponse inflammatoire au cours d'une régénération musculaire. Cependant, ce récepteur est acquis pendant les premières phases d'une régénération par les cellules satellites afin d'activer la voie p38-MAPK et ainsi inhiber la différenciation musculaire. Au cours du vieillissement, le maintien de l'expression de ce récepteur sur cette population cellulaire induit un prolongement de l'inhibition de la différenciation musculaire, signe d'une défaillance dans le processus de régénération[268].

b. Le changement de micro-environnement au cours du vieillissement

Différentes études mettent en évidence que le micro-environnement provenant de souris jeunes peut rétablir les fonctions des cellules souches ainsi que les capacités régénératives musculaires. En effet, par exemple, Conboy et ses collaborateurs montrent que les composants du sérum de souris jeunes permettent, à eux seuls, de rétablir au niveau moléculaire (la voie NOTCH, détaillée ci-dessus) et cellulaire, les fonctions des cellules satellites (activation et prolifération). De plus, cette étude montre également une altération des composants du sérum de souris âgées, influençant de manière négative les fonctions des cellules satellites[269].

Enfin, au sein de la niche elle-même, des cytokines pro-inflammatoires sont surexprimées telles que le IL6 et TNFα[270]. Elles impactent de manière importante la prolifération et la différenciation myogénique[271,270].

c. Les altérations des voies de signalisation nécessaires à la régénération musculaire

Cet environnement systémique modifié induit des altérations sur les voies de signalisation impliquées dans les processus régénératifs, à commencer par la voie WNT. En effet, des études montrent, tout d'abord, une augmentation de cette voie au cours du vieillissement dans les progéniteurs myoblastiques. Plus en détails, des

cellules provenant de souris âgées expriment davantage les cibles en aval de WNT comme Axin2, ou encore des composants activateurs de cette voie comme la protéine β-caténine. Associée à ces augmentations, les auteurs observent également une diminution des protéines permettant une inhibition de la voie comme la protéine GSK3β. Ces trois événements témoignent d'une meilleure activation de la voie WNT au cours du vieillissement[272]. De plus, dans une autre étude visant à caractériser les voies moléculaires impliquées dans cette perte de régénération avec l'âge, une diminution de l'expression de deux inhibiteurs de la voie WNT, qui sont sfrp2 et Wif1, a été montrée dans un muscle entier[273]. Enfin, tous ces changements d'expression des différents acteurs de la voie WNT induisent un moins bon maintien du lignage myoblastique des cellules souches, associé à une conversion des progéniteurs myoblastiques vers un destin fibrogénique lors d'une blessure musculaire[272]. Cette conversion, due également à l'activation de l'axe WNT/TGFβ2, est retrouvée dans la myopathie de Duchenne (= DMD pour Duchenne Muscular Dystrophy,)[274]. Dans les deux modèles, le vieillissement naturel ou la DMD, l'inhibition de cette voie conduit à une réduction des cellules se dirigeant vers un phénotype fibroblastique mais également à une meilleure prolifération myoblastique avec une restauration des processus de régénération.

En plus de la voie WNT, sa voie antagoniste est également altérée. Différentes études observent une diminution, dans les cellules satellites activées et dans les myofibres provenant d'individus âgés, de l'expression du ligand de la voie NOTCH (le ligand delta « Δ_1 ») et de son récepteur $NOTCH_1$, induisant une baisse des capacités prolifératives des cellules[275]. Forcer l'activation de la voie NOTCH dans le muscle âgé induit une restauration de ses capacités[275].

Associé à cette diminution, on voit également un excès de l'activation de la voie antagoniste de NOTCH sur le contrôle de la prolifération des cellules satellites: la voie TGFβ/pSmad3, induisant une accumulation des CDKi[276] associée à une surexpression des gènes impliqués dans la sénescence[276]. Ces perturbations interfèrent avec les capacités régénératives des cellules souches musculaires *in vivo*. Bloquer cette voie permet de les restaurer. Ces résultats sont aussi observables chez l'homme[277].

En plus de ces voies, d'autres voies vont être modifiées chez des souris âgées. En effet, Tierney et ses collaborateurs émettent l'hypothèse qu'une suractivation de la voie JAK2/STAT3 va induire une inhibition prolongée de l'expansion des cellules

satellites associée à une activation de la différenciation myogénique. Ces deux phénomènes induiraient, à terme, un épuisement du *pool* de cellules souches, décrit au cours du vieillissement[199]. De manière intéressante, une autre équipe valide cette hypothèse dans le contexte du vieillissement. En effet, Price et ses collaborateurs démontrent qu'associer à la diminution du nombre de cellules satellites, la voie JAK2/STAT3 est suractivée avec l'âge. L'inhibition de cette suractivation permet une expansion des cellules satellites ainsi qu'une meilleure réparation du muscle squelettique. Ainsi, la voie JAK/STAT participe à l'épuisement du *pool* de cellules souches, observé chez des souris âgées[278].

d. Les changements des proportions des cellules immunitaires et de leurs fonctions.

Bien que la population des macrophages totaux, caractérisée par le marqueur $CD68^+$, est plus importante chez les souris jeunes après une blessure, il semblerait que la population des macrophages M2 soit plus augmentée dans un muscle de souris âgées[279,280,281]. Il semblerait donc que les macrophages de souris âgées soient moins capables de s'adapter et de maintenir une fonction inflammatoire. Il en découle une moins bonne activation des cellules satellites et à terme un retard dans le processus de régénération. De plus, compte tenu de cette augmentation de macrophages M2, on peut penser que les sécrétions, libérées par ce type de macrophages comme l'IL-10, varient dans le même sens. Cependant, il semblerait que cette cytokine soit diminuée dans un muscle âgé, suite à une blessure[281]. Ces discordances entre la proportion de macrophages et leurs sécrétions sont également retrouvées pour les macrophages de type M1. En effet, malgré une diminution de la proportion de ces macrophages, l'expression des molécules libérées par cette population tel que l'iNOS ou le TNF-α, est augmentée dans un muscle âgé[281].

Ce résultat peut paraitre surprenant compte tenu de l'inflammation chronique de bas bruit qui apparait avec l'âge. Cependant, deux hypothèses peuvent expliquer ce résultat : i) une proportion plus importante de ces macrophages M2 dans un muscle non lésé[280,282] et ii) l'augmentation de la cytokine IL-10 au cours du vieillissement[283], cytokine permettant la transition d'un phénotype M1 vers un phénotype M2, comme expliqué ci-dessus. A noter que le rôle de l'IL10 dans cette observation n'a pas été totalement établi. De plus, une étude tend à affirmer qu'il existe une réponse similaire

dans l'infiltration des cellules inflammatoires (les leucocytes et les macrophages) dans le processus de régénération musculaire[279].

En plus de ces modifications de proportion de populations présentes au cours de la régénération avec l'âge, il semblerait que les progéniteurs macrophagiques ne puissent pas être capables de soutenir la myogenèse et ses différentes phases comme celle de la prolifération et de la différenciation[284]. Ces dysfonctions passent notamment par une altération de certaines sécrétions. Pour ne citer que quelques exemples, la sécrétion de molécules telles que le GDF_3, l'ostéopontine ou encore Klotho est modifiée avec l'âge. Brièvement, dans un muscle blessé de souris jeune, GDF_3, faisant partie de la famille des TGF, permet la fusion musculaire[285]. Or, cette cytokine au cours du vieillissement voit ses taux diminuer, et cela s'accompagne d'un ralentissement de la régénération[286]. Cette diminution n'est, cependant, pas due à une réduction du nombre de macrophages. Concernant, l'ostéopontine, son expression est augmentée en cas de régénération musculaire[287] et permet d'inhiber la migration et la fusion musculaire[288]. A l'inverse du GDF_3, ses taux sont augmentés au cours du vieillissement[289]. Enfin, Klotho, protéine augmentée dans le cadre d'une régénération par déméthylation de son promoteur, permet une meilleure régénération musculaire[290]. L'absence de cette protéine induit une diminution de nombre de cellules Pax_7^+ ainsi que du nombre de clusters (témoin de la prolifération), une augmentation du pourcentage de fibres positives pour la myosine embryonnaire et une diminution du nombre de cellules $Pax_7^-/MyoD^+$ (= cellules qui entrent dans la phase de différenciation musculaires). Ces travaux démontrent également que Klotho permet une inhibition de la voie WNT canonique dans les cellules myogéniques[291]. Dans le cadre du vieillissement lors d'une régénération musculaire, la déméthylation du promoteur de Klotho ne s'effectue pas, induisant la perte de l'augmentation de cette protéine[290]. De ce fait, l'inhibition de la voie WNT canonique est perdue, induisant une perte des capacités régénératives des cellules myogéniques.

Ces trois exemples de modification des sécrétions des macrophages témoignent qu'en plus des modifications directes sur la cellule myogénique au cours du vieillissement, le système immunitaire est également modifié avec l'âge, altérant à son tour les capacités de myogenèse des cellules musculaire.

e. Les modifications liées à l'âge des autres cellules impliquées dans la régénération musculaire

Au cours du vieillissement, de la même manière que pour les cellules myogéniques et les cellules inflammatoires, certaines altérations ont été observées concernant la population des FAPs. Dans un premier temps, il semblerait que les sécrétions des cellules myogéniques soient modifiées et altèrent certains processus des FAPs comme la prolifération qui est diminuée. Ceci semble être dû à un défaut de la phosphorylation et de l'activation de la voie AKT fibrogénique[228].

Parmi les différents facteurs libérés par les FAPs, certains voient leur sécrétion et expression altérées avec le vieillissement. C'est notamment le cas de Bmp3p. La sécrétion de ce facteur est diminuée chez l'individu âgé, induisant une augmentation de la différenciation des FAPs en cellules adipocytaires avec une diminution de la force musculaire, deux marqueurs du phénotype sarcopénique[212]. Il a également été montré que l'IL-33 était moins présente au cours du vieillissement dans un muscle, induisant un moindre recrutement, ainsi qu'une diminution de la prolifération et de la rétention des lymphocytes T régulateurs, importants pour les processus de régénération musculaire[219]. Enfin, WSP-1, un facteur libéré par les FAPs, notamment pendant la régénération, est également diminué avec l'âge. Cette diminution altère la différenciation des FAPs vers le phénotype adipogénique, mais empêche également le soutien porté aux cellules souches musculaires lors de la régénération musculaire, altérant les capacités régénératives[226].

LA RÉGÉNÉRATION MUSCULAIRE : PROCESSUS ALTÉRÉ AVEC L'ÂGE

Lié au vieillissement, on observe différentes perturbations dans ce processus de régénération qui sont :

- La perte des capacités myogéniques telles que la baisse du nombre de cellules souches, le défaut du maintien de quiescence, la géro-conversion des cellules satellites….
- Les changements du micro-environnement, induisant des pertes des capacités de régénération musculaire.
- Les altérations des voies de signalisation comme par exemple :
  - L'augmentation de la voie WNT, induisant un moindre maintien du lignage myoblastique.
  - L'hyper-phosphorylation de p38-MAPK, conduisant à des pertes d'auto-renouvèlement.
  - La diminution de la voie NOTCH, induisant une moindre prolifération des cellules satellites.
- Les changements dans les proportions et capacités des cellules immunitaires et des FAPs.

IV. La fibrose

La synthèse de collagène et la formation d'une MEC transitoire est indispensable et réversible au cours des processus de régénération. Cependant, quand le traumatisme est soit trop répété soit trop important, le processus devient alors irréversible. Cette irréversibilité est également présente quand il existe des dérégulations des voies. L'une des causes principales est l'activation persistante des myofibroblastes (**Figure 12**). En effet, alors que dans un muscle à l'état basal, ces cellules sont éliminées par apoptose, ces cellules peuvent persister même après la résolution des lésions, créant un déséquilibre homéostatique tissulaire. On voit alors apparaitre un déséquilibre dans la balance entre la lyse et la synthèse de cette MEC. Ce phénomène se nomme fibrose. Elle est caractérisée par une accumulation excessive de MEC et de ses composants comme le collagène ou encore la fibronectine. Au niveau histologique, on observe une augmentation de la taille de l'endomysium et du périmysium. Elle apparait dans plusieurs pathologies comme les dystrophies musculaires (exemple avec la maladie de Duchenne (= DMD)), l'obésité, le diabète[292], ou encore suite à des immobilisations[293] et au cours du vieillissement. Alors que dans un muscle « sain », le fibroblaste est la principale cellule qui sécrète cette MEC, lors de ces pathologies, les cellules inflammatoires, les cellules

myogéniques (myofibres et cellules satellites) et les cellules endothéliales contribuent également à cette surproduction.

LA FIBROSE :

En résumé :

- La fibrose correspond à une accumulation excessive des composants de la MEC.
- Elle apparait après un traumatisme trop important ou trop répétée.
- C'est un processus irréversible.
- Elle est retrouvée dans différentes pathologies.

Avec l'âge, on observe une augmentation de fibrose caractérisée par un excès de dépôt de la matrice et plus particulièrement du collagène. De plus, les modifications du collagène comme les liaisons croisées non enzymatiques se retrouvent modifiées induisant un changement de rigidité des protéines de la MEC contribuant aux altérations observées avec le vieillissement[294].

Plusieurs publications, notamment celle de Brack et ses collaborateurs en 2007, démontrent qu'au cours d'un vieillissement physiologique, les modifications des voies de signalisation sont impliquées dans la survenue de cette fibrose. C'est notamment le cas avec la voie de signalisation WNT qui est fortement impliquée dans l'apparition de ce processus. En effet, comme dit ci-dessus, les auteurs observent que le changement de l'environnement systémique observé au cours du vieillissement induit une augmentation de la signalisation WNT dans les cellules myogéniques permettant une conversion vers un phénotype fibrotique[272]. De plus, une autre étude confirme l'implication de cette voie dans ce processus. En effet, avec le vieillissement, les myoblastes donnent naissance à une population cellulaire non myogénique et non adipogénique caractérisée par les marqueurs $CD45^-$, $MyoD^-$, Sca_1^+, qui présentent alors des altérations dans l'expression des gènes de la voie WNT, dans le potentiel myogénique des myoblastes et enfin, présentent également une augmentation des gènes de la fibrose, contrôlés par la voie WNT2[295]. De plus, comme déjà évoqué, l'hormone IGF1 permet, grâce à la séquestration de Smad3 par p-AKT, de contrôler cette fibrose. Cependant, au cours du vieillissement, il est bien établit que le taux de cette hormone diminue au niveau plasmatique[296]. De ce fait, l'interaction entre les deux protéines ne se fait pas au niveau cytoplasmique, induisant une translocation de Smad3 au niveau nucléaire. On voit alors apparaitre une activation des gènes de la fibrose[251].

Dans un contexte de vieillissement physiologique, les cytokines ont également un rôle à jouer dans ces dérégulations. Comme cité ci-dessus, la cytokine TGF-β est l'une des cytokines majeures impliquées dans le processus de fibrose. Elle permet d'activer l'expression de plusieurs protéines de la MEC comme la fibronectine, le *plasminogen activator inhibitor 1* (= PAI-1) et le CTGF. En 2004, une étude démontre que la voie du ce CTGF est activée de manière constitutive dans les progéniteurs myogéniques du muscle âgé, et ce malgré la régulation à la baisse des récepteurs observée au cours du vieillissement, comme en témoigne l'augmentation de la phosphorylation de la voie Smad2/3 ainsi que l'augmentation de l'expression génique de la fibronectine, du PAI-1 et de CTGF [276,297]. Associé à cette idée, l'expression génique et protéique[276,297] de cette cytokine au sein de ces cellules est augmentée, notamment pour l'isoforme TGF-β_3. Ces dérégulations de la voie TGF-β/Smad sont impliqués dans les défauts de fibrose observés au cours du vieillissement. A noter cependant que l'activation constitutive de cette voie n'induit pas tous les effets connus du TGF-β. En effet, ils n'observent pas les effets inhibiteurs sur la différenciation musculaire[297].

LA FIBROSE LIÉE AU VIEILLISSEMENT :

Cette fibrose est due à :

- Une dérégulation de certaines voies de signalisation comme par exemple la voie WNT et son rôle dans le destin myogénique ou fibrogénique.
- Une augmentation ou diminution des cytokines et de l'IGF-1, respectivement.

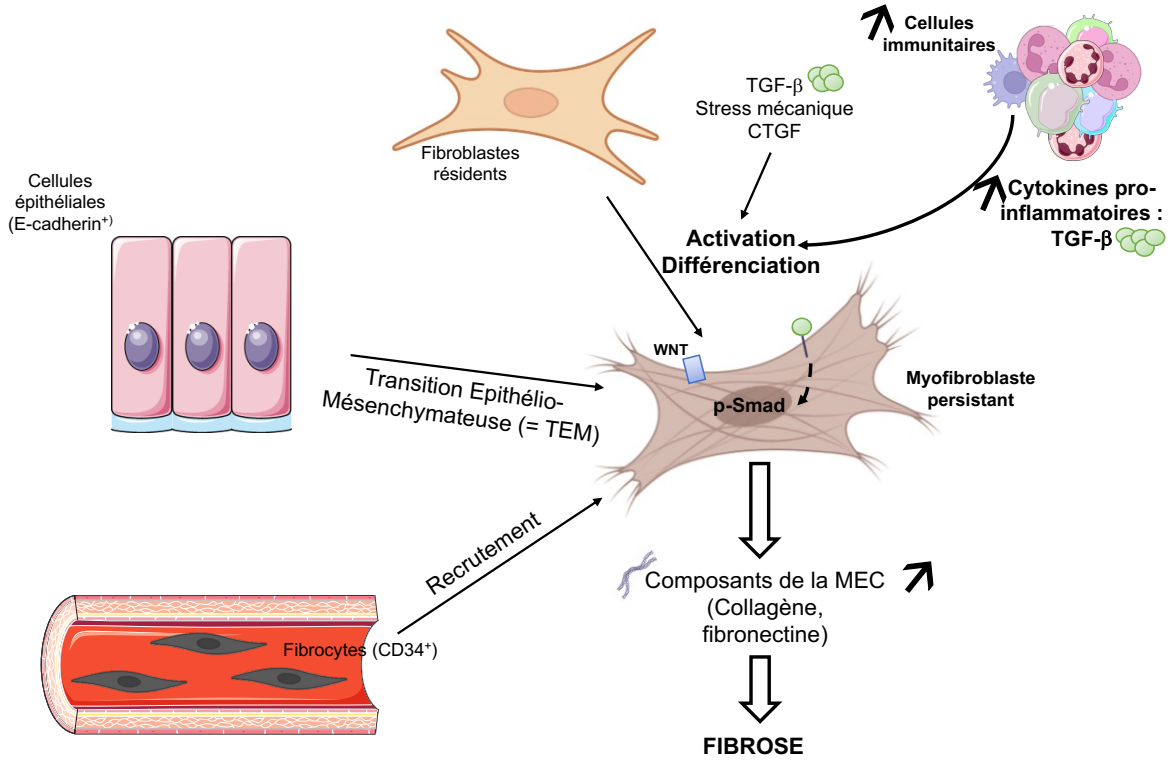


Figure 12 : Dérégulations du processus de la matrice extra-cellulaire transitoire.
Lors de blessures répétées ou lors du vieillissement/pathologies, les cellules inflammatoires restent présentes continuent à sécréter les molécules pro-fibrotiques. Les myofibroblastes persistent et continuent à sécréter les différents types de collagène, créant une accumulation de la matrice extra-cellulaire. Ce phénomène est appelé **FIBROSE**.

Nous venons de décrire les différents mécanismes impliqués dans l'apparition et le développement de la sarcopénie. Nous allons maintenant détailler les différentes molécules qui peuvent impacter ces mécanismes et nous nous sommes concentrés sur les facteurs circulants.

PARTIE II : IDENTIFICATION DE NOUVELLES MOLÉCULES IMPLIQUÉES DANS LE DÉVELOPPEMENT DE LA SARCOPÉNIE

I. Les facteurs circulants principaux identifiés

Le micro-environnement du muscle peut impacter différentes fonctions ou mécanismes qui participent au développement de la sarcopénie. Les facteurs circulants font partis de ce micro-environnement et certains ont été décrits comme des facteurs impactant le muscle squelettique. Parmi les facteurs circulants, on retrouve les facteurs de croissance comme l'IGF-1 ou encore la myostatine (=GDF-8), les hormones sexuelles telles que la testostérone et enfin les différentes cytokines de l'inflammation.

Le tableau ci-dessous est non exhaustif et reprend quelques exemples de facteurs circulants impactant la physiologique du muscle squelettique ainsi que les variations associées à l'âge et leur impact lors du vieillissement musculaire. Aujourd'hui, différents essais cliniques sont en cours, ciblant l'un de ces facteurs, afin de ralentir la survenue et la progression de la sarcopénie. Vous trouverez quelques exemples d'essais cliniques dans la dernière colonne de ce tableau.

Nom protéine ou molécule	Rôles	Variations au cours du vieillissement	Observations	Exemples d'essais cliniques en cours
IGF-1 298,299,300,301,296,302	-Active l'hypertrophie musculaire. -Active la prolifération des cellules satellites chez le rat âgé.	Diminution (-)	-GH régule sa synthèse. -Associé à la perte musculaire liée à l'âge. -Diminution taux de GH avec l'âge	**Cible la voie IGF-1 :** -GH Secretagogue (Phase I) -Ibutamoren (MK677) GH Secretagogue (Phase II) -Growth hormone (GH) (Phase III)
Myostatine (= GDF-8) 303,304,301,305,302	-Diminue la masse musculaire. -Inhibe la protéosynthèse par interaction avec AKT.	+/- Controversé dans la littérature	-Différence liée au sexe.	**Cible la myostatine :** - BYM338 (Bimagrumab) (Phase II) - REGN1033 (Trevagrumab) (Phase II)
Testostérone 306,307,308,309,310,311 312,313,314,315	-Active la prolifération des cellules satellites et augmentation du nombre -Active la différenciation myogénique des cellules souches mésenchymateuses pluripotentes -Active la protéine AKT et inhibe $FoxO_3$ (activation de la protéosynthèse)	Diminution (-)		**Cible la testostérone :** -Testosterone (Phase IV et III) - Angrogel (testosterone gel)
TNF-α 316,317	-Inhibe la différenciation musculaire	Augmentation (+)	-Associée à la diminution de la force spécifique et maximale.	
IL-6 317,318,319,320,321		Augmentation (+)	-Associée à des désordres liés à l'âge. -Inhibe l'action de IGF-1	

Tableau 1 : Tableau récapitulatif sur les facteurs circulants agissant sur le muscle squelettique, leurs variations au cours du vieillissement et les essais cliniques en cours reportés dans ClinicalTrials.gov database

Plusieurs organes ont des fonctions endocriniennes et peuvent libérer ces différents facteurs dont le muscle squelettique lui-même ou encore le tissu adipeux blanc. Cependant comme mentionné dans la revue ci-dessus, le tissu adipeux blanc voit sa fonction sécrétoire extrêmement modifiée avec l'âge. En effet, il va libérer différents facteurs dont certains pro-inflammatoires. Nous allons dans le prochain chapitre aborder les différents changements qui s'opèrent au niveau fonctionnel, morphologique et sécrétoire dans ce tissu au cours du vieillissement et les impacts connus sur les autres tissus.

II. Les nouvelles stratégies développées : le tissu adipeux blanc, organe clé dans la sécrétion de facteurs circulants

Le tissu adipeux blanc est un tissu qui présente différentes fonctions au sein de l'organisme : i) une fonction de stockage, ii) un rôle dans le maintien de l'homéostasie métabolique et enfin, iii) une fonction sécrétoire. Grâce à ses fonctions, ce tissu permet de maintenir une homéostasie au sein de l'organisme. Cependant, depuis quelques années, des études montrent des changements de ces fonctions avec l'âge impactant les autres tissus.

Dans cette partie, nous allons aborder les différents changements du tissu adipeux blanc qu'ils s'opèrent au cours du vieillissement ainsi que leurs impacts.

1. Les modifications du tissu adipeux blanc au cours du vieillissement

Dans cette revue, que j'ai eu l'occasion de co-écrire pendant ma deuxième année de thèse, nous avons énuméré les différentes modifications que subit le tissu adipeux blanc au cours du vieillissement et les conséquences associées. Brièvement, la répartition de ce tissu au sein de l'organisme est modifiée en faveur d'une localisation plus profonde (= viscérale). Cette redistribution est due à différentes causes dont une modification en systémique des taux d'hormones sexuelles comme la testostérone ou les œstrogènes ou encore la perte de capacité de stockage du tissu adipeux blanc sous-cutanée.

En plus de la nouvelle répartition de ce tissu, ses capacités intrinsèques sont également modifiées. Ce tissu subit une moindre extension qui altère les capacités de

stockage, associée à une diminution de la capacité de mobilisation des lipides par la lipolyse. Enfin, l'une des dernières altérations recensées est la fonction sécrétoire, modifiée en faveur d'un sécrétome pro-inflammatoire (SASP pour *senescence associated secretory phenotype*), associé à des modifications de la sécrétion des adipokines (adiponectine, leptine…).

Aujourd'hui, différentes études soulignent l'implication de la sénescence des adipocytes et des cellules de la fraction stroma-vasculaire dans toutes ces modifications observées avec l'âge.

Med Mal Metab 2021; 15: 142-148

en ligne sur / *on line on*
www.em-consulte.com/revue/mmm
www.sciencedirect.com

Modifications du tissu adipeux au cours du vieillissement

Clémence Tropis, Marie Catenacci, Philippe Valet, Cédric Dray

Disponible sur internet le :
17 février 2021

Institut RESTORE, Université de Toulouse, CNRS U-5070, EFS, ENVT, Inserm U1301, Université Paul Sabatier, 4, bis avenue Hubert Curien, 31100 Toulouse, France

Correspondance :
Cédric Dray, Institut RESTORE, Université de Toulouse, CNRS U-5070, EFS, ENVT, Inserm U1301, Université Paul Sabatier, 4, bis avenue Hubert Curien, 31100 Toulouse, France.
cedric.dray@inserm.fr

Mots clés
Vieillissement
Tissu adipeux
Adipokines
Inflammation
Sénescence

Résumé

Le tissu adipeux est un organe central jouant de multiples rôles, comme la protection thermique, le stockage énergétique, la sécrétion d'hormones participant à l'homéostasie générale. Au cours du vieillissement, le tissu adipeux blanc (TABl) subit un remodelage quantitatif et qualitatif. En effet, il est à la fois le siège d'une redistribution géographique, de remodelages cellulaires et d'une modification de ses capacités fonctionnelles. La relocalisation du TABl sous-cutané au profit du TABl viscéral et l'augmentation du stockage ectopique de lipides (foie, pancréas, muscle) s'accompagnent de la modification de son profil sécrétoire et de sa cellularité. À cela, s'ajoutent l'apparition de cellules sénescentes au sein du tissu adipeux et la perte des capacités de renouvellement des cellules progénitrices. Ainsi, ces modifications du TABl entraînent une altération de l'homéostasie générale et contribuent à l'insulino-résistance, à une dysfonction cardiovasculaire, à la perte de mobilité, mais également aux dysfonctions cognitives en participant au phénomène d'inflammation systémique générale retrouvée au cours du vieillissement. Une meilleure compréhension des effets de l'âge sur le TABl devrait permettre d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques pour lutter contre la fragilité associée à l'âge et améliorer la qualité de vie en ciblant cet organe central.

Keywords
Aging
Adipose tissue
Adipokines
Inflammation
Senescence

Summary

Adipose tissue alterations during aging

White adipose tissue (WAT) plays a central role in human homeostasis by acting on energy storage, adipokines secretion and inflammation. During aging, WAT is quantitatively and qualitatively altered and may participate to the onset of age-related pathologies. Indeed, progressive loss of subcutaneous adipose tissue mass and its targeted localization in visceral adipose depot associated with adipose tissue secretory and cellular profile alterations as well as ectopic lipids

10.1016/j.mmm.2021.01.010
© 2021 Publié par Elsevier Masson SAS.

accumulation are often linked to age related diseases such as neurodegenerative alterations, loss of mobility, diabetes, cardiovascular dysfunctions and so on. Moreover, adipose tissue is involved in the phenomenon of inflammaging *leading to a systemic chronic low-grade inflammation that is common hallmark of all the pathologies of aging. Thus, understanding WAT modifications during aging displays promising options in order to improve quality of life and promote healthy aging.*

Introduction

Au cours des prochaines années, en France, la part de la population âgée de plus de 60 ans atteindra plus de 20 % de la population. Cette augmentation de la longévité s'accompagne d'une survenue plus importante de pathologies chroniques liées à l'âge, comme les troubles cardiovasculaires, le diabète, les maladies rénales ou neurodégénératives, ou encore une survenue plus importante des cas de cancers [1]. Afin d'expliquer cette occurrence plus importante, différents mécanismes cellulaires impliquant les régulations épigénétiques, biochimiques ou métaboliques ont été avancés. Plus récemment, de nombreuses études s'accordent sur le fait que le vieillissement des tissus est associé à une accumulation de cellules sénescentes correspondant à un arrêt définitif du cycle cellulaire [2]. Cette accumulation semble être causée par le fait que les cellules sénescentes deviennent progressivement résistantes à l'apoptose avec l'âge [3]. En conséquence de cet état cellulaire, le développement d'une inflammation chronique dite de bas bruit s'installe avec l'âge et participe à l'entretien de l'état de sénescence des cellules.

Au niveau métabolique, le vieillissement se caractérise par une altération des réponses oxydatives, une sensibilité à l'insuline perturbée, et une mauvaise gestion des flux énergétiques. Parmi les organes associés au maintien de l'homéostasie et des dépenses énergétiques, on retrouve le tissu adipeux blanc qui assume la grande majorité des capacités de stockage/restitution énergétiques de l'organisme. Au cours de l'avancée en âge, les tissus adipeux blancs (TABl) subissent des modifications quantitatives et qualitatives dues à une modification du mode de vie (alimentation plus riche/baisse de l'activité physique) associée à des perturbations hormonales. Ainsi, plusieurs études ont pu observer qu'à partir de 65 ans s'opère une augmentation du pourcentage de la masse grasse au dépend de la masse maigre [4]. Cette accumulation de masse grasse s'accompagne d'une relocalisation du TABl d'un compartiment sous-cutané vers une localisation plus profonde et viscérale et, dans certains cas, d'un stockage ectopique des lipides dans différents tissus. Comme nous allons le décrire dans cette revue, le vieillissement altère également les capacités fonctionnelles des cellules qui composent le TABl. En effet, le TABl de la personne âgée présente :

- une diminution de ses fonctions régénératrices due à une altération des capacités de différenciation de ses cellules souches ;
- une diminution de ses capacités de stockage lipidique ;
- une modification des sécrétions endocrines de l'adipocyte et de la fraction stromale pouvant contribuer à une accélération des processus de vieillissement de l'organisme via, entre autres, une inflammation chronique de bas bruit.

Ainsi, le TABl pourrait jouer un rôle central dans l'initiation, le maintien ou l'amplification de certaines pathologies associées au vieillissement, et ainsi devenir une cible thérapeutique prometteuse dans la lutte contre les pathologies liées au vieillissement.

Les points essentiels

- Augmentation du vieillissement de la population et des troubles associés à l'âge.
- Vieillissement associé à des altérations quantitatives et qualitatives du tissu adipeux.
- Relocalisation du tissu adipeux blanc (TABl) lié à une modification du profil hormonal et des capacités de stockage.
- Modifications intrinsèques des fonctions de stockage et sécrétoires du TABl.
- Apparition de cellules sénescentes dans l'environnement du TABl associé à une inflammation chronique de bas grade.

Modifications anatomiques des tissus adipeux blancs

Nouvelles répartitions des tissus adipeux

Une étude menée dans les années 1990 a montré qu'une relocalisation du TABl s'opère avec l'âge [5]. En effet, à l'instar de ce qui a pu être observé au cours de l'obésité, le vieillissement s'accompagne d'une augmentation de la taille adipocytaire et du volume du tissu adipeux profond au détriment d'une légère diminution du tissu adipeux localisé en position sous-cutanée [5]. Cette redistribution des TABl semble trouver son origine dans deux mécanismes différents. Premièrement, il a pu être démontré que le TABl sous-cutané perd progressivement ses capacités de stockage avec l'avancée en âge. Ceci aura pour conséquence directe de rediriger les excès de substrats énergétiques vers le TABl profond responsable de nombreux désordres métaboliques. Parallèlement à cela, une large part de la redistribution des tissus adipeux est attribuée aux effets des

hormones d'origine sexuelles. L'influence des hormones sexuelles sur la distribution du TABl est bien documentée et a permis d'expliquer la différence de localisation chez les adultes jeunes [6]. En effet, chez l'homme, le TABl est localisé au niveau viscéral, on parle alors de répartition androïde, alors que chez la femme non ménopausée, il est majoritairement localisé au niveau sous-cutané glutéo-fémoral (répartition gynoïde). Cependant, au cours du vieillissement, la baisse des taux des estrogènes signant la ménopause va entraîner une relocalisation du TABl au niveau viscéral chez la femme [7]. Parallèlement, les récepteurs α aux œstrogènes, présents principalement dans les adipocytes du tissu adipeux sous-cutané et associés à une augmentation de l'activité de la lipoprotéine lipase et à l'accumulation de triacylglycérol [8] voient leur expression décroître avec le vieillissement. Ces études démontrent également le rôle du rapport testostérone/œstradiol dans la localisation du tissu adipeux avec l'âge [9]. Chez l'homme, on peut observer une diminution des taux de testostérone plasmatique qui va jouer un rôle important dans la localisation du TABl. Ainsi, une supplémentation en testostérone chez des sujets masculins permet d'éviter la relocalisation du tissu adipeux au niveau viscéral et est associée à un meilleur stockage des lipides [10] grâce à une augmentation des récepteurs α2-adrénergiques [11]. De ce fait, hommes et femmes voient une redistribution de leur tissu adipeux au niveau central au cours de l'âge dépendant des variations des hormones sexuelles [6].

Le tissu adipeux viscéral étant directement associé à la présence de dysfonctions cardiovasculaires participant au syndrome métabolique, cette relocalisation liée à l'âge constitue un facteur de risque majeur chez la personne âgée [12]. Ainsi, cette redistribution pourrait participer au phénomène de fragilité décrite chez la personne âgée.

Localisation ectopique des lipides

Comme nous l'avons vu précédemment, la redistribution du TABl s'accompagne de la relocalisation des lipides du tissu adipeux sous-cutané au niveau du TABl viscéral. Cependant, l'excès de substrat énergétique peut aussi se localiser de façon ectopique dans d'autres tissus, comme le foie, le muscle squelettique ou le pancréas [13,14]. Comme cela a déjà pu être décrit au cours de pathologies métaboliques associées à l'obésité, cette présence anormale de lipides ectopiques conduit à une augmentation des mécanismes inflammatoires induits par les phénomènes de lipotoxicité. Au niveau mécanistique, cette lipotoxicité va induire une augmentation des espèces réactives de l'oxygène et, à terme, l'activation des voies nuclear factor-kappa B (NFκB) ou de la protéine kinase C (PKC) induisant la plupart des désordres métaboliques [15]. La présence de ces lipides au niveau hépatique est associée à une altération spécifique du métabolisme du glucose participant à l'insulino-résistance régulièrement observée chez la personne âgée. Au niveau musculaire, les dépôts ectopiques lipidiques se retrouvent localisés au niveau inter- et intramusculaire. De façon intéressante, la présence de ces lipides dans les cellules musculaires est associée à l'altération des capacités musculaires, avec une diminution de la force et de la mobilité, mais aussi de la consommation du glucose participant ainsi à l'insulinorésistance [16]. Enfin, une accumulation de lipides au sein du pancréas a été observée et participe à l'altération fonctionnelle de ce tissu au cours du vieillissement [14]. Les altérations du TABl jouent donc un rôle central au cours du vieillissement en impactant le métabolisme global, mais également, et plus spécifiquement, en altérant le fonctionnement d'autres organes (*figure 1*). Tous ces phénomènes concourent à l'augmentation de l'occurrence des troubles cardiovasculaires, tels que l'athérosclérose chez la personne âgée, mais également à des troubles musculo-squelettiques, comme la sarcopénie.

Conséquences du vieillissement sur les capacités intrinsèques du tissu adipeux

Modification des fonctions de stockage adipocytaire au cours du vieillissement

Les adipocytes sont les cellules majoritaires du tissu adipeux. Elles ont pour rôle principal le stockage de l'énergie au sein de leur vacuole lipidique et sa restitution en cas de besoin. Ces adipocytes sont issus du processus d'adipogenèse au cours duquel des progéniteurs, les pré-adipocytes, se différencient en adipocytes matures. L'une des premières fonctions du TABl altérée au cours du vieillissement est la capacité de ces progéniteurs à se différencier. En effet, la diminution de l'expression du récepteur de prolifération des peroxysomes (PPAR□) et du facteur de transcription adipogénique « CCAAT/enhancer binding α » (C/EBPα), essentiel à l'adipogenèse, est observée au cours du vieillissement dans des cultures primaires d'adipocytes de rats [17]. Ainsi, les progéniteurs adipocytaires de rats âgés présentent, *in vitro*, une moins bonne capacité de différenciation comparée à ceux d'animaux jeunes [18]. De plus, l'augmentation d'inhibiteurs de la voie de C/EBPα, l'isoforme C/EBPβ-LIP et C/EBP HomolOgous Protein (CHOP), dans les pré-adipocytes a été constatée au cours du vieillissement, et donc une inhibition de la cascade de signalisation de la différenciation adipocytaire [19]. La conséquence directe de ces mécanismes intracellulaires est une diminution de la taille des adipocytes (hypotrophie) qui va s'ajouter à une diminution de la capacité des cellules souches pré-adipocytaires à renouveler le stock d'adipocytes (hypoplasie) [20]. À l'opposé de ce qui se passe au cours des premiers stades de l'obésité, cette perte de fonction contribue à une moindre extension du tissu adipeux, induisant une altération des capacités à accumuler ou à mobiliser des lipides.

Parallèlement à l'altération des processus adipogéniques, l'adipocyte âgé est aussi le siège d'une perturbation de ses capacités intrinsèques de stockage et mobilisation de lipides. En effet, il a été observé qu'avec l'âge, les adipocytes des TABl sous-cutanés

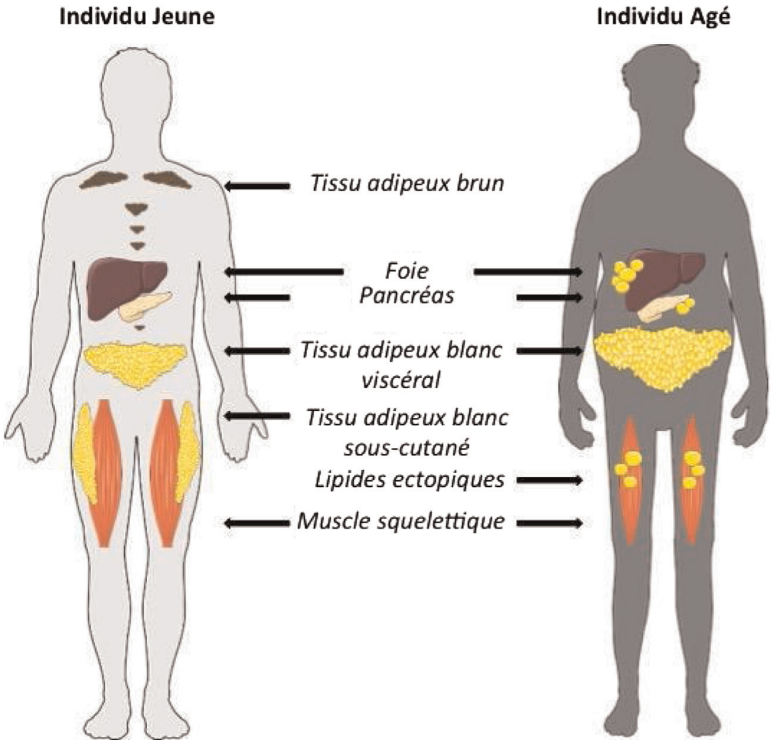


FIGURE 1
Schéma des modifications anatomiques des tissus adipeux blancs et bruns au cours de l'âge

et viscéraux perdent cette capacité de stockage [21]. La mobilisation lipidique - ou lipolyse - est l'une des fonctions majeures du tissu adipeux qui consiste en la libération des acides gras stockés dans le tissu adipeux suite à une demande énergétique. La lipolyse adipocytaire est, elle aussi, impactée avec l'âge, elle est diminuée chez l'homme et le rongeur âgé. Ceci s'explique par une diminution de stimulation de la voie β-adrénergique (activatrice de la lipolyse) au profit de la voie α2-adrénergique (inhibitrice de la lipolyse). L'AMP cyclique (AMPc), nécessaire à l'activation de cette voie, se trouve diminué, impactant l'activation de la lipolyse [22]. De plus, Hoffman et al. démontrent qu'une libération d'adénosine endogène chez des souris âgées participe également à cette altération [23].

Modification des fonctions sécrétrices au cours du vieillissement

Le tissu adipeux possède une fonction endocrine cruciale via la sécrétion de molécules bioactives (cytokines, chimiokines, hormones...) décrites sous le nom d'adipokines. Au cours du vieillissement, ces sécrétions sont modifiées et participent à l'inflammation de bas bruit associée au vieillissement (*figure 2*). En effet, Wu et al. montrent que l'expression génique des cytokines pro-inflammatoires, telles que l'interleukine (IL)-1β, l'IL-6 et le tumor necrosis factor α (TNF-α), est augmentée dans le tissu adipeux viscéral chez des souris âgées [24]. Parallèlement à cette inflammation de bas bruit, l'adiponectine, hormone reflétant l'activité adipogénique et sécrétée par les adipocytes matures, est diminuée [25]. Compte tenu de son rôle dans la différenciation adipogénique, la sensibilité à l'insuline et le stockage des acides gras, on peut supposer que cette diminution participe également aux dérégulations observées au cours du vieillissement [25]. La leptine, autre adipokine impliquée dans le phénomène de satiété, est augmentée chez les souris âgées. Ces concentrations, semblables à celle retrouvée dans des conditions d'obésité, témoignent d'une moindre sensibilité à la leptine avec l'âge [26]. De plus, au sein du TABl, les cellules de la fraction stroma-vasculaire, et notamment les cellules immunes, subissent un important remodelage au cours du vieillissement. Une modification au niveau du phénotype des lymphocytes T et des macrophages a ainsi été observée chez les souris âgées [27]. En effet, une diminution des macrophages anti-inflammatoires de type M2 au profit de macrophages de type M1 - dits pro-inflammatoires - et une augmentation des lymphocytes T a été observée. Ce remodelage immun participe

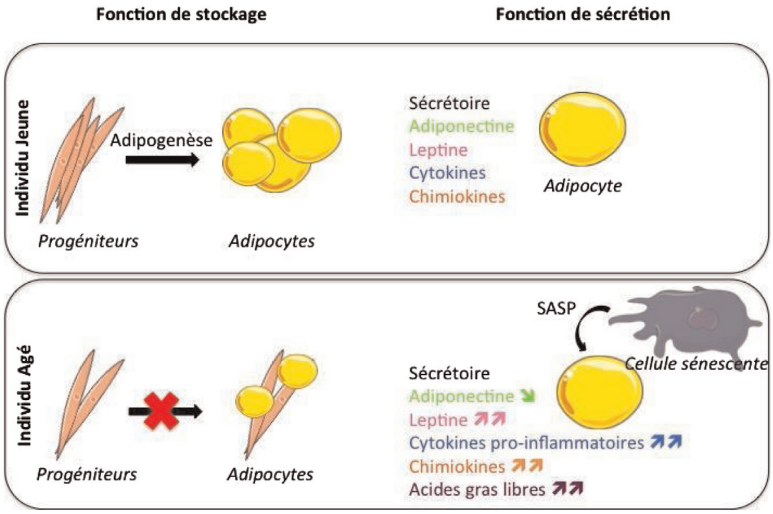


FIGURE 2
Fonctions du tissu adipeux altérées au cours du vieillissement

à l'inflammation et à la résistance à l'insuline retrouvées au sein du TABl au cours de l'âge. Ces changements cellulaires et sécrétoires peuvent être impliqués dans l'installation de certaines maladies, comme les maladies neurodégénératives (maladie d'Alzheimer). Il a été montré, par exemple, qu'une surproduction de leptine, similaire aux concentrations retrouvées en condition d'obésité, induisait une résistance au niveau du système nerveux central et, à terme, une atrophie cérébrale associée à des troubles neurodégénératifs [28]. De plus, ces taux anormaux de leptine induisent une phosphorylation des protéines Tau et β-amyloïde, impliquées dans la maladie d'Alzheimer, entraînant une altération des performances cognitives [28]. Compte tenu de la surproduction de cytokines pro-inflammatoires induite par le tissu adipeux chez les personnes âgées, ces mécanismes semblent corrélés à la mise en place des troubles cognitifs, ainsi que des maladies neurologiques retrouvées au cours du vieillissement [29].

Impact de la sénescence sur les altérations des tissus adipeux blancs

La sénescence est définie comme un arrêt définitif du cycle cellulaire. Ce phénomène est observé en réponse à plusieurs facteurs, tels qu'un raccourcissement des télomères, des dommages à l'ADN, l'activation d'oncogènes, ou en réponse à un stress. Au cours du vieillissement, les stress environnementaux ne cessent d'augmenter, conduisant à l'accumulation de cellules sénescentes [2]. Ces cellules subissent des modifications, tant au niveau phénotypique qu'au niveau sécrétoire. En effet, les cellules sénescentes possèdent un sécrétome qui leur est propre, le SASP (pour *Senescent Associated Secretory Phenotype*). On y retrouve des cytokines pro-inflammatoires, des chimiokines, des métalloprotéases, ou encore des facteurs de croissance. Via le SASP, les cellules sénescentes participent à la dérégulation des fonctions essentielles pour l'homéostasie tissulaire.

La sénescence du TABl est de plus en plus étudiée afin de comprendre l'impact de cet état cellulaire sur les fonctions de ce tissu [30]. De façon intéressante, on comprend mieux le rôle délétère de ces cellules grâce à des expériences de coculture de ces adipocytes sénescents et de progénitures adipocytaires. En effet, l'équipe de James Kirkland a pu montrer le rôle des sécrétions d'adipocytes sénescents en observant qu'au cours de ces expériences de cocultures entre des adipocytes sénescents et des pré-adipocytes issus d'individus jeunes, les progéniteurs adipogéniques perdaient leurs capacités de différenciation [18]. De plus, la sénescence des adipocytes est associée directement à la perte des fonctions adipogéniques intrinsèques et, via l'induction d'un SASP responsable d'une inflammation dite stérile, du recrutement de cellules immunes pro-inflammatoires, telles que des macrophages au sein du TABl [31]. Ces régulations ont pu être observées chez la souris, mais également chez l'homme âgé [32]. Afin de démontrer l'importance des sécrétions du TABl au cours du vieillissement, des expériences d'inhibition du SASP ont permis de montrer le rôle du TABl et de ses sécrétions sur les capacités physiques et la fragilité observées chez des souris âgées. De plus, des travaux ont montré, grâce à une stratégie de blocage dans les adipocytes, qu'un facteur clé de la sénescence (tumor protein 53 [P53]), induit une perte de la sensibilité à l'insuline, ainsi qu'une augmentation des cytokines pro-inflammatoires, tel que le TNFα [33]. Ces résultats soulignent le rôle de la sénescence des cellules du TABl dans les dysfonctions métaboliques et

l'inflammation retrouvées au cours du vieillissement. Tous ces phénomènes concourent à la perte de fonction adipocytaire, aussi bien au niveau du stockage que des sécrétions.

Conclusion

L'augmentation de la proportion de la population âgée au niveau mondial observée ces dernières années s'accompagne d'une diminution de la qualité de vie et d'un coût socio-économique majeur. Dans ce contexte, le tissu adipeux est de plus en plus considéré comme une des cibles potentielles dans la lutte contre la fragilité liée au vieillissement. En effet, si le rôle de ce tissu a longtemps été peu considéré dans la lutte contre les pathologies liées au vieillissement, il apparaît aujourd'hui primordial de mieux comprendre ses dysfonctions au cours de l'avancée en âge afin de pouvoir appréhender au mieux ces changements. Ainsi, la redistribution des capacités de stockage énergétique, qu'elle soit viscérale ou ectopique, est délétère pour l'organisme et doit faire l'objet d'une adaptation des comportements, tant au niveau nutritionnel qu'au niveau des dépenses énergétiques (exercice physique). De même, agir sur les nouvelles caractéristiques fonctionnelles et sécrétoires du TABl qui ont lieu avec l'avancée en âge permettrait de ralentir l'apparition de pathologies liées au vieillissement en maintenant les capacités fonctionnelles de l'individu. Pour cela, différentes approches sont envisageables, qu'elles soient centrées sur un certain contrôle du métabolisme ou par une approche pharmacologique. En effet, la maîtrise du métabolisme chez l'organisme âgé par des adaptations quantitatives ou qualitatives de l'apport calorique (restriction calorique ou alimentation adaptée à la chronobiologie) permettent de réguler la masse grasse et de normaliser les capacités fonctionnelles du TABl. De même, cibler directement les cellules sénescentes par les sénolytiques semble très prometteur quant au maintien de l'intégrité de ce tissu malgré le vieillissement. Quelle que soit l'intervention pratiquée, une mise en place précoce au cours de la vie de l'individu, ou une application tardive adaptée selon l'âge, permettraient de contrer ou de limiter les effets délétères des modifications du TABl. Tout ceci permettrait d'atténuer les altérations fonctionnelles associées au vieillissement et, ainsi, de diminuer la morbidité liée à l'âge en favorisant un vieillissement en bonne santé.

Déclaration de liens d'intérêts : les auteurs déclarent ne pas avoir de liens d'intérêts.

Références

[1] World Health Organization (WHO).. Ageing and health; 5 February 2018. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2018 [https//www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/ageing-and-health].
[2] Tchkonia T, Zhu Y, van Deursen J, et al. Cellular senescence and the senescent secretory phenotype: therapeutic opportunities. J Clin Invest 2013;123:966–72.
[3] Narita M, Lowe SW. Senescence comes of age. Nat Med 2005;11:920–2.
[4] Guo SS, Zeller C, Chumlea WC, Siervogel RM. Aging, body composition, and lifestyle: the Fels Longitudinal Study. Am J Clin Nutr 1999;70:405–11.
[5] Schwartz RS, Shuman WP, Bradbury VL, et al. Body fat distribution in healthy young and older men. J Gerontol 1990;45:M181–5.
[6] Fantin F, Di Francesco V, Fontana G, et al. Longitudinal body composition changes in old men and women: interrelationships with worsening disability. J Gerontol A Biol Sci Med Sci 2007;62:1375–81.
[7] Ley CJ, Lees B, Stevenson JC. Sex- and menopause-associated changes in body-fat distribution. Am J Clin Nutr 1992;55:950–4.
[8] Frank AP, de Souza Santos R, Palmer BF, Clegg DJ. Determinants of body fat distribution in humans may provide insight about obesity-related health risks. J Lipid Res 2019;60:1710–9.
[9] Ambikairajah A, Walsh E, Tabatabaei-Jafari H, Cherbuin N. Fat mass changes during menopause: a metaanalysis. Am J Obstet Gynecol 2019;221:393–409 [.e50].
[10] Allan CA, Strauss BJ, Burger HG, et al. Testosterone therapy prevents gain in visceral adipose tissue and loss of skeletal muscle in nonobese aging men. J Clin Endocrinol Metab 2008;93:139–46.
[11] Saulnier-Blache JS, Bouloumie A, Valet P, et al. Androgenic regulation of adipocyte alpha 2-adrenoceptor expression in male and female Syrian hamster: proposed transcriptional mechanism. Endocrinology 1992;130:316–27.
[12] Després JP, Lemieux I. Abdominal obesity and metabolic syndrome. Nature 2006;444:881–7.
[13] Cree MG, Newcomer BR, Katsanos CS, et al. Intramuscular and liver triglycerides are increased in the elderly. J Clin Endocrinol Metab 2004;89:3864–71.
[14] Saisho Y, Butler AE, Meier JJ, et al. Pancreas volumes in humans from birth to age on hundred taking into account sex, obesity, and presence of type-2 diabetes. Clin Anat 2007;20:933–42.
[15] Yu C, Chen Y, Cline GW, et al. Mechanism by which fatty acids inhibit insulin activation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1)-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity in muscle. J Biol Chem 2002;277:50230–36.
[16] Katsiaras A, Newman AB, Kriska A, et al. Skeletal muscle fatigue, strength, and quality in the elderly: the Health ABC Study. J Appl Physiol (1985) 2005;99:210–6.
[17] Karagiannides I, Tchkonia T, Dobson DE, et al. Altered expression of C/EBP family members results in decreased adipogenesis with aging. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 2001;280:R1772–80.
[18] Kirkland JL, Hollenberg CH, Gillon WS. Age, anatomic site, and the replication and differentiation of adipocyte precursors. Am J Physiol 1990;258:C206–10.
[19] Karagiannides I, Thomou T, Tchkonia T, et al. Increased CUG triplet repeat-binding protein-1 predisposes to impaired adipogenesis with aging. J Biol Chem 2006;281:23025–33.
[20] Caso G, McNurlan MA, Mileva I, et al. Peripheral fat loss and decline in adipogenesis in older humans. Metabolism 2013;62:337–40.
[21] Koutsari C, Ali AH, Nair KS, et al. Fatty acid metabolism in the elderly: effects of dehydroepiandrosterone and testosterone replacement in hormonally deficient men and women. J Clin Endocrinol Metab 2009;94:3414–3423.

[22] Hoffman BB, Chang H, Farahbakhsh ZT, Reaven GM. Age-related decrement in hormone-stimulated lipolysis. Am J Physiol 1984;247:E772–7.
[23] Hoffman BB, Chang H, Farahbakhsh Z, Reaven G. Inhibition of lipolysis by adenosine is potentiated with age. J Clin Invest 1984;74:1750–5.
[24] Wu D, Ren Z, Pae M, et al. Aging up-regulates expression of inflammatory mediators in mouse adipose tissue. J Immunol 2007;179:4829–39.
[25] Fu Y, Luo N, Klein RL, Garvey WT. Adiponectin promotes adipocyte differentiation, insulin sensitivity, and lipid accumulation. J Lipid Res 2005;46:1369–79.
[26] Li H, Matheny M, Nicolson M, et al. Leptin gene expression increases with age independent of increasing adiposity in rats. Diabetes 1997;46:2035–9.
[27] Lumeng CN, Liu J, Geletka L, et al. Aging is associated with an increase in T cells and inflammatory macrophages in visceral adipose tissue. J Immunol 2011;187:6208–16.
[28] Rajagopalan P, Toga AW, Jack CR, et al. Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative. Fat-mass-related hormone, plasma leptin, predicts brain volumes in the elderly. Neuroreport 2013;24:58–62.
[29] Michaud M, Balardy L, Moulis G, et al. Proinflammatory cytokines, aging, and age-related diseases. J Am Med Dir Assoc 2013;14:877–82.
[30] Tchkonia T, Morbeck DE, Von Zglinicki T, et al. Fat tissue, aging, and cellular senescence. Aging Cell 2010;9:667–84.
[31] Xu M, Tchkonia T, Ding H, et al. JAK inhibition alleviates the cellular senescence-associated secretory phenotype and frailty in old age. Proc Natl Acad Sci U S A 2015;112:E6301–10.
[32] Xu M, Palmer AK, Ding H, et al. Targeting senescent cells enhances adipogenesis and metabolic function in old age. Elife 2015;4:e12997.
[33] Minamino T, Orimo M, Shimizu I, et al. A crucial role for adipose tissue p53 in the regulation of insulin resistance. Nat Med 2009;15:1082–7.

2. Le tissu adipeux, organe clé dans le dialogue inter-organe avec le muscle squelettique : le rôle des adipokines au cours du vieillissement

Ce tissu est donc un organe sécrétoire qui peut dialoguer avec les autres tissus. Depuis quelques années, il a été mis en évidence que le tissu adipeux, *via* ses sécrétions, va pouvoir interagir avec le muscle squelettique. Comme cité dans la revue, le tissu adipeux subit des modifications au cours du vieillissement, notamment au niveau de ses sécrétions. Cette partie résume, de manière non exhaustive, les modifications des adipokines ayant un rôle au sein du muscle squelettique.

Bien qu'il existe une controverse sur ses variations au cours du vieillissement, les taux de leptine ont été associés à une inflammation ectopique dans le muscle, conduisant à une atrophie musculaire *via* l'expression des deux atrogènes MuRF1 et atrogin-1[322]. De plus, il a été observé une diminution de la sensibilité à la leptine avec l'âge[323]. Chez l'homme il existe une association négative entre les concentrations sériques de leptine et la densité des muscles abdominaux[324]. Une autre étude confirme cette association puisque les auteurs démontrent que les individus avec de fortes concentrations sériques de leptine ont une forte incidence au niveau de la fragilité et la faiblesse musculaire[325].

Concernant la participation de l'adiponectine dans le développement de la sarcopénie, son rôle reste encore mal compris. En effet, des études se contredisent quant à ses effets. Une étude démontre que de faibles taux sériques de cette adipokine sont observés chez des individus sarcopéniques par rapport à des individus non sarcopéniques[326]. Cependant, d'autres études mettent en évidence une association entre les taux élevées de cette adipokine avec une diminution de l'aire des fibres musculaires, de la faible densité musculaire, de la perte fonctionnelle et de l'augmentation de l'incidence de la sarcopénie[327,328].

Malgré les corrélations faites entre les variations de ces adipokines et les altérations sur le muscle au cours du vieillissement, très peu d'études mettent en évidence que les altérations des concentrations de ces adipokines sont dues principalement à des dysfonctions du tissu adipeux.

Seule la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires a été montrée comme augmentée au cours du vieillissement par le tissu adipeux chez la souris[329]. Compte tenu des effets négatifs de l'IL-6, du TNF-α et de MCP-1 détaillés dans la première sous partie, ces molécules pro-inflammatoires participent à la perte de la masse et de la fonction musculaire, observée avec le vieillissement.

LES ALTÉRATIONS DES SÉCRÉTIONS DES ADIPOKINES ET LES CONSÉQENCES LIÉES AU VIEILLISSEMENT :

En résumé, on observe au cours du vieillissement :

- Une diminution de la sensibilité à la leptine et de ses effets positifs sur le muscle squelettique.
- Une controverse des effets et des variations de l'adiponectine avec l'âge et dans le cadre de la sarcopénie.
- Une augmentation de la libération des cytokines pro-inflammatoires et des effets qui leur sont attribués dans le muscle squelettique.

Dans ce contexte, au sein du laboratoire, une analyse protéomique différentielle croisée sur du sang et des milieux conditionnés d'explants de tissus adipeux blanc issus de souris âgées de 3, 12 et 24 mois, associée à une analyse approfondie de la littérature ont permis de sélectionner 15 protéines variant de manière significative entre les souris âgées de 3 et 24 mois et les souris âgées de 3 et 12 mois. Une analyse génique de ces 15 protéines a été réalisée sur du tissu adipeux provenant de souris âgées de 12 et 24 mois et a permis d'identifier 3 protéines qui sont augmentées au cours du vieillissement dans le tissu adipeux blanc : la Teneurine (Tenm3), la protéine s100a4 et **l'haptoglobine**. Ces données sont spécifiques au tissu adipeux viscéral et plus précisément aux adipocytes composant ce tissu. Après une analyse bibliographique, notre choix d'étude s'est porté sur **l'haptoglobine**. En effet, en 2014, une étude a décrit un rôle sur le muscle squelettique, rôle qui sera détaillé dans la partie « haptoglobine ».

III. L'haptoglobine, cible potentiel de la lutte contre la sarcopénie ?

1. L'haptoglobine : définitions

L'haptoglobine (= Hp) a été décrite pour la première fois par Polonovski et Joyle, en 1938. C'est une glycoprotéine tétramérique circulante, découverte dans le plasma humain. Elle est composée de deux paires de chaines peptidiques : deux chaines alpha et deux chaines bêta. Son gène est localisé sur le chromosome 16q22.

a. Le polymorphisme de l'haptoglobine

Chez l'homme, contrairement aux autres mammifères, il existe une duplication de l'allèle 1 générant l'allèle 2. Trois phénotypes résultent de cette duplication, à savoir : Hp1-1, Hp2-1 et Hp2-2. Le phénotype le plus retrouvé dans la population est le Hp2-1. Chez l'homme, le polymorphisme est associé à des susceptibilités dans certaines pathologies. En effet, le phénotype Hp1-1 est corrélé à une susceptibilité plus importante aux maladies infectieuses par parasite[330] alors que le phénotype 2-2, lui, est associé plutôt aux maladies métaboliques et aux complications associés[331] (comme la NAFLD et sa sévérité) mais protecteur envers des infections telles que la malaria[332]. De plus, en Europe occidentale, il est connu que 16% de la population possède l'isoforme Hp1-1, 48% possède l'isoforme Hp2-2 et 36% possède l'isoforme Hp2-2. La distribution de ces phénotypes varie selon les zones géographiques étudiées (Hp2 est majoritairement retrouvée en Asie alors que Hp1 est plutôt en Afrique et dans l'Amérique du Sud).

b. Localisation de l'haptoglobine : les organes, cellules et fluides

L'haptoglobine est principalement exprimée et sécrétée par le foie, notamment lors de la phase aigüe de l'inflammation[333]. Sa synthèse est extrêmement rapide et lors d'une inflammation, ses taux augmentent nettement. Toutefois, d'autres organes comme le tissu adipeux, la rate, le rein, le muscle et les poumons l'expriment et la sécrètent. Dans le tissu adipeux blanc, plusieurs études ont été menées afin de savoir quelles cellules l'expriment. Toutes ces publications arrivent à la conclusion que seuls les adipocytes, et non les cellules de la fraction stroma-vasculaire (= FSV), des

différents tissu adipeux blancs l'expriment, aussi bien chez l'homme que chez la souris[334,335]. De plus, ils démontrent que l'haptoglobine est exprimée seulement dans les derniers jours de la différenciation adipocytaire. Enfin, dans certaines conditions, le tissu adipeux blanc peut voir son expression d'haptoglobine augmenter, comme dans le cas d'une obésité génétique ou nutritionnelle[334].

Au niveau des fluides biologiques, l'haptoglobine est retrouvée dans le fluide cérébrospinal, l'urine mais également et majoritairement dans le plasma à une concentration comprise entre 0,3 et 3mg/mL.

Enfin, la littérature montre que cette protéine peut se lier sur deux récepteurs : i) le récepteur scavenger CD163, présent à la surface des macrophages/monocytes[148] et ii) le récepteur CCR2 (récepteur aux chimiokines CC)[336]. Nous détaillerons plus loin dans ce manuscrit les rôles associés à chaque complexe formé.

2. Régulations et rôles de l'haptoglobine

a. L'haptoglobine : une protéine liée à l'inflammation

L'haptoglobine est étroitement liée à l'inflammation. En effet, elle a été d'abord décrite comme étant une protéine de la phase aigüe de l'inflammation[337]. A ce jour, elle est considérée comme un marqueur de l'inflammation en clinique, au même titre que la protéine C réactive ou la vitesse de sédimentation des érythrocytes. De plus, de nombreuses études relient l'expression et la sécrétion d'haptoglobine à l'inflammation et plus précisément aux cytokines pro-inflammatoires. Dans les hépatocytes mais également dans les adipocytes, l'expression de cette protéine est augmentée par les cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL1-β, l'IL6 [338] et le TNF-α[339]. Pour les hépatocytes, ces cytokines sécrétées dans les phases aigues de l'inflammation, se lient sur le récepteur présent sur ces cellules et activent, *via* la voie STAT3 et C/EBP-β, la transcription du gène de l'haptoglobine. La spécificité des cytokines à réguler la transcription de ce gène dépend des sous-unités du récepteur présents sur les cellules cibles ainsi que du degré d'activation des voies intracellulaires. Par exemple, la cytokine IL-6 engage la sous-unité commune gp130, formant ainsi un complexe avec le récepteur compétent. De plus, l'IL-6 à forte

concentration et LIF à faible concentration permettent une induction forte du gène de l'haptoglobine alors que l'oncostatin M (=OSM) entraîne une induction plus faible[340]. Dans le cadre du tissu adipeux blanc et des adipocytes, Nascimento et ses collaborateurs observent une augmentation de l'expression de l'haptoglobine après une traitement des cellules 3T3-L1 (= lignée cellulaire capable de se différencier en adipocytes) avec de l'IL6, du TNF-α ou encore du LPS (= traitement qui s'apparente à une infection induisant une activation du système immunitaire)[334]. Toutefois, ce résultat est controversé chez l'homme, puisqu'un traitement de TNF-α sur des adipocytes primaires humains induit une diminution de l'haptoglobine. Une autre preuve de sa liaison étroite avec l'inflammation est la sécrétion de cette molécule par une des cellules inflammatoires présentes en cas de dommages tissulaires : les neutrophiles. Ces cellules inflammatoires stockent l'haptoglobine dans des granules et la libèrent après avoir été activés par différents stimuli (présence d'une bactérie ou *via* une cytokine pro-inflammatoire)[341].

Malgré sa présence en cas d'inflammation et sa régulation par les cytokines pro-inflammatoires, l'haptoglobine détient un rôle anti-inflammatoire. Cette protéine se lie et forme un complexe avec une protéine libérée dans le sérum lors de blessures ou d'infections : $HMGB_1$. Ce complexe est ensuite internalisé par les macrophages, *via* un des récepteurs à l'haptoglobine : CD163. Les macrophages se mettent, alors, à exprimer des marqueurs d'une réponse anti-inflammatoire comme l'interleukine-10 (= IL-10) et l'HO-1[342]. Ce résultat est confirmé par une autre étude qui démontre qu'un traitement à l'haptoglobine seul induit une diminution des facteurs inflammatoires des macrophages stimulés et activés par le LPS, *via* une liaison et internalisation d'$HMGB_1$[343].

b. L'haptoglobine : rôle dans la réponse antioxydante

Aujourd'hui, il existe plusieurs études qui démontrent le rôle principal de l'haptoglobine concernant la prise en charge de l'hémoglobine (= Hb) libérée lors de l'hémolyse intravasculaire dans des conditions physiologiques ou pathologiques. En effet, une fois l'hémoglobine libérée dans le plasma due à la rupture des érythrocytes, elle va se lier à l'haptoglobine libre afin de créer un complexe Hp-Hb. Cette liaison, se faisant sur la chaine β de l'haptoglobine, est stable ($K_d = 10^{-15}$) et de grande affinité.

Ce complexe permet donc de réduire la toxicité associée à l'hémoglobine[344] puisque la formation de ce complexe permet de créer un épitope unique, reconnu par le récepteur scavenger CD163[148], présent à la surface des monocytes/macrophages, notamment ceux du foie appelés les cellules de Kupffers. Une étude démontre que la chaine-β de l'haptoglobine est essentielle pour la reconnaissance du récepteur vis-à-vis du complexe formé[345]. Une fois lié au récepteur, le complexe va être internalisé puis dégradé. Il a été observé que l'absence d'haptoglobine induit, une accumulation anormale d'hémoglobine dans les tubules proximaux du rein, associée à une diminution de sa présence dans les deux organes majeurs de sa clairance : le foie et la rate. Cependant, cette accumulation n'induit pas de dommages dans la morphologie ou dans la fonction rénale. Il est donc admis que la clairance de l'hémoglobine est faite malgré l'absence de l'haptoglobine[346]. A noter qu'une étude démontre que l'absence de l'haptoglobine, étudiée par le biais de souris déficiente pour celle-ci, induit une mortalité plus importante des souris, associée à une augmentation des dommages oxydatifs par l'hémoglobine et à l'absence de réparation totale des tissus rénaux endommagés[347].

En plus de rôle protecteur vis-à-vis de l'hémoglobine sur le rein, l'haptoglobine protège également l'hémoglobine de potentiels modifications oxydatives. L'H_2O_2 induit des modifications irréversibles de la structure de l'hémoglobine comme la formation de liaisons transversales de la chaine α-globine mais également l'oxydation des acides aminés dans les régions importantes de la chaine β-globine, nuisant à l'endocytose de cette protéine par le récepteur CD163. L'haptoglobine la protège de ces modifications et de cette manière, la clairance de l'hémoglobine médiée par le récepteur CD163 est similaire, même dans des conditions de stress oxydatif[348]. On peut donc conclure avec ces différentes études que l'haptoglobine a un rôle anti-oxydant vis-à-vis de l'hémoglobine.

c. L'haptoglobine, protéine présente dans le cadre de l'obésité, quelle est son rôle ?

Des études ont fait le lien entre l'obésité et l'haptoglobine, notamment par le biais de cytokines pro-inflammatoires. Dans des modèles d'obésité, comme les souris ob/ob et db/db, la cytokine pro-inflammatoire TNF-α est augmentée, conduisant à une

activation de l'expression de l'haptoglobine dans le tissu adipeux blanc[349]. Ce lien est confirmé chez des souris déficientes pour le TNF-α ou son récepteur dans le cadre de l'obésité, qui présentent une diminution de l'expression de l'haptoglobine. Une étude réalisée à partir d'explants de tissu adipeux chez l'homme confirme la surproduction de cette glycoprotéine par les adipocytes du tissu adipeux blanc viscéral et le tissu adipeux blanc sous-cutanée[335]. Cette protéine est donc, aujourd'hui, considérée comme un biomarqueur circulant associé à l'obésité[350].

Au niveau fonctionnel, l'haptoglobine agit sur deux processus lors de l'obésité : i) le recrutement de cellules inflammatoires dans le tissu adipeux blanc et ii) les désordres métaboliques et morphologiques du tissu adipeux blanc.

Concernant le recrutement des cellules inflammatoires dans un cadre d'obésité, des chercheurs ont émis l'hypothèse que l'haptoglobine pouvait avoir un rôle dans la chimio-attraction des macrophages présents dans un tissu adipeux d'individu obèse. Ainsi en 2009, Maffei et ses collaborateurs démontrent que l'haptoglobine, dans des conditions physiologiques, est capable de se lier au récepteur CCR2, d'induire son internalisation afin de l'activer. Ce processus est similaire à celui engendré par la liaison du ligand principal de CCR2 : MCP-1. Une fois le récepteur présent sur les macrophages activé par l'haptoglobine, la voie de signalisation ERK1/2 est activée, permettant une libération plus importante du facteur de chimio-attraction MCP-1. De cette manière, l'haptoglobine participe au recrutement massif de macrophages et à l'inflammation de bas bruit observés dans le cadre d'une obésité[336].

Concernant les désordres métaboliques et morphologiques du tissu adipeux blanc, il a été établi que l'haptoglobine jouait un rôle. En effet, chez des souris dépourvues d'haptoglobine soumises à un régime gras (= HFD), les auteurs observent un meilleur contrôle de l'homéostasie glucidique avec i) une augmentation de la sensibilité à l'insuline, ii) une tolérance au glucose améliorée, iii) une diminution de la stéatose hépatique et enfin iv) une baisse de la population des macrophages au sein du tissu adipeux blanc[351]. De plus, la perte de cette protéine induit une diminution de la taille des adipocytes, associée à une augmentation de l'expression de deux marqueurs clés de l'hydrolyse des triglycérides : i) la périlipine et ii) la Lipase HormonoSensible (= LHS) ainsi que des gènes impliqués dans l'angiogénèse[352]. L'haptoglobine est donc impliquée dans l'hyperplasie/hypertrophie du tissu adipeux blanc, observée en cas de régime riche en graisses ainsi que les désordres liés à un tel régime.

Il est important de souligner que les régimes riches en moyennes (= régime à base d'huile de coco) ou longues (= régime à base de lard) chaines d'acides gras saturés[353], permettent une meilleure expression de l'haptoglobine au niveau des différents tissus adipeux blancs. Le type de régime ainsi que la durée module l'expression du gène de cette protéine dans les différents tissus adipeux blanc comme le tissu adipeux blanc épidydimal, le sous-cutané ou encore le rétro-péritonéal. La déxaméthasone[334] et les agonistes β-adrénergiques[334] permettent également d'activer son expression. A *contrario*, le Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-γ (= PPAR- γ)[334,354] réprime son expression dans les adipocytes de ce tissu.

d. Rôle de l'haptoglobine dans les cancers

Dans des conditions non physiologiques telles que les cancers urogénitaux ou les lymphomes, l'haptoglobine est retrouvée en plus grande concentration. Certaines études ont donc corrélé les concentrations d'haptoglobine et les cancers. De plus, l'haptoglobine se retrouve diminuée chez des individus en rémission, renforçant cette corrélation[355,356].

En plus de cette corrélation, une étude a émis l'hypothèse d'un potentiel rôle de l'haptoglobine dans les cancers. En effet, des travaux réalisés dans le cadre du cancer ovarien, démontrent qu'un traitement à l'haptoglobine induit une expression de CCR2 par les cellules cancéreuses ainsi qu'un réarrangement cytoplasmique, associé à une meilleure capacité de migration. L'haptoglobine joue potentiellement un rôle dans le processus de métastase des cellules cancéreuses[357].

e. Le rôle de l'haptoglobine sur le muscle squelettique : rôle dans la prévention de la faiblesse musculaire

Le stress oxydatif participe au développement de la sarcopénie. Ce processus induit une détérioration des fonctions de différents organes. Comme cité ci-dessus, l'haptoglobine possède un rôle antioxydant. De ce fait, Maffei et ses collaborateurs en 2014 ont étudié l'impact de la perte de cette protéine et de son rôle sur les fonctions antioxydantes sur les cellules musculaires, dans des conditions normales et, dans le cadre de challenges aigus comme un exercice physique ou, chroniques avec un régime HFD. Sans challenge, l'absence de l'haptoglobine induit une atrophie

musculaire observée par une diminution de l'aire des fibres. Cette atrophie musculaire est induite par une activation de la protéolyse, observée par une augmentation du système UPS et de l'autophagie, mais également par une inhibition de la protéosynthèse, observée par une diminution de la phosphorylation d'AKT, reflet de son activité. Dans des conditions de challenge, les souris déficientes à l'haptoglobine présentent une réponse antioxydante inadéquate, induisant une faiblesse musculaire observée par une diminution des fonctions musculaires et une diminution de l'aire des fibres. Cette étude révèle un rôle critique de l'haptoglobine dans la prévention de l'oxydation des protéines et de la faiblesse musculaire[358].

f. L'haptoglobine, une protéine induite par le vieillissement, quelles en sont les conséquences ?

Différentes études menées chez la souris[359] et chez l'homme[360] ont observé une augmentation plasmatique de l'haptoglobine au cours du vieillissement. De plus, cette glycoprotéine a été corrélée de manière positive à la maladie d'Alzheimer[361]. Enfin, chez des rat âgés, elle a été retrouvée dans l'hippocampe[362].

Cette augmentation au cours du vieillissement peut potentiellement participer à des désordres liés à l'âge. Ainsi, comme cité ci-dessus, une étude au sein du laboratoire a pu mettre en évidence une augmentation de l'haptoglobine dans le plasma mais également dans le tissu adipeux des souris au cours du vieillissement. Cette étude a permis également de démontrer que l'augmentation observée avec l'âge dans le tissu adipeux blanc est liée à la sénescence de ce tissu et plus précisément, à la protéine p16. En effet, des souris hétérozygotes pour p16 présentent une diminution de l'expression de l'haptoglobine dans le tissu adipeux blanc. De plus, une induction de la sénescence sur des adipocytes in *vitro* induit une augmentation de l'expression de celle-ci (**Figure 13A et 13B**). Réciproquement, un traitement à l'haptoglobine induit une sénescence des cellules en culture (**Figure 13C et 13D**). Enfin, ces travaux démontrent également qu'une augmentation systémique de l'haptoglobine induit une perte des fonctions métaboliques du tissu adipeux. En effet, les souris traitées à l'haptoglobine présentent une augmentation de l'expression des gènes de l'inflammation et de la sénescence, associée à des altérations fonctionnelles, observées par une diminution de la fonction de lipolyse du tissu adipeux blanc (**Figure 13E-G** - datas non publiées).

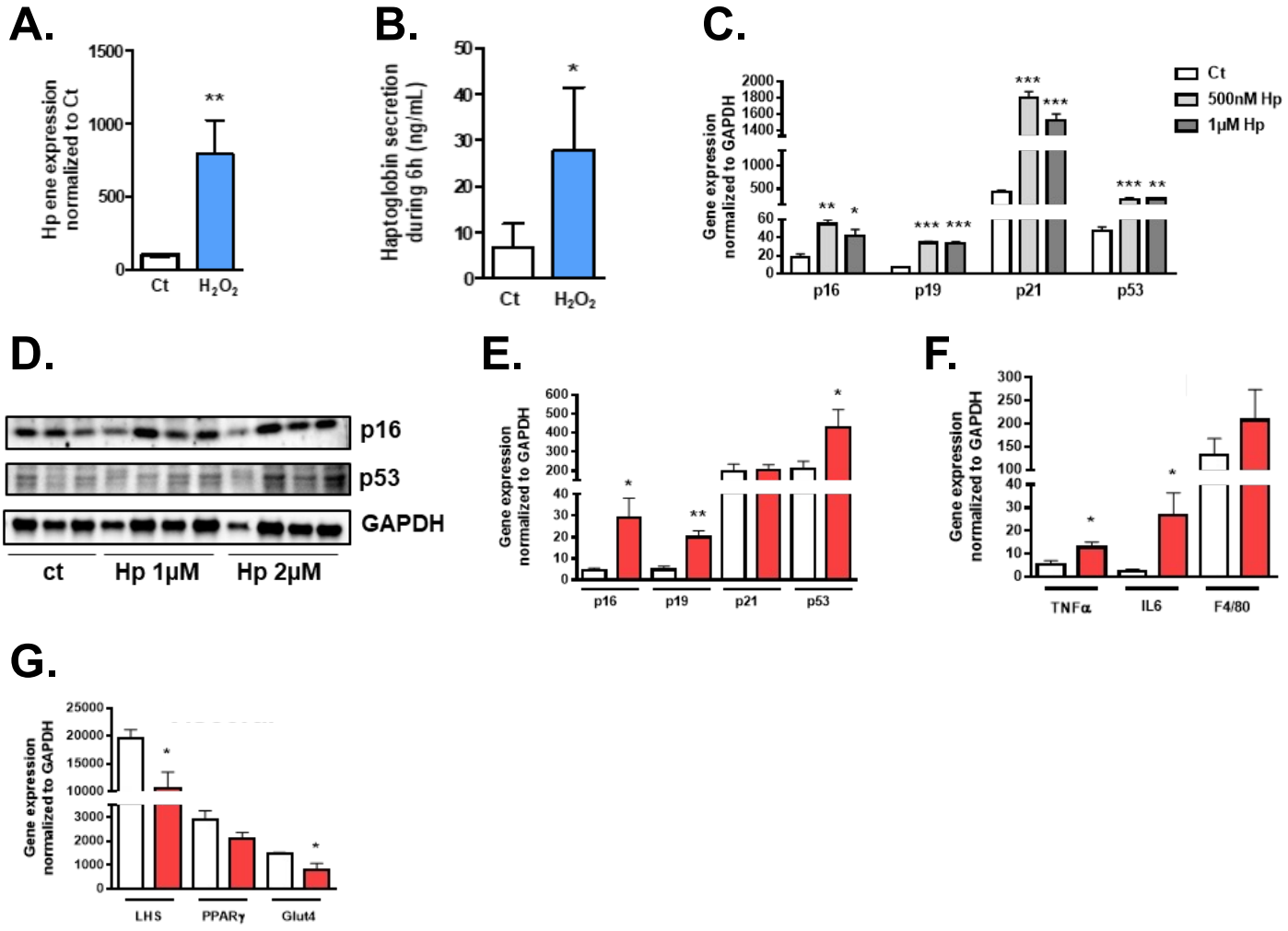


Figure 13 : Rôles *in vitro* et *in vivo* de l'haptoglobine sur le tissu adipeux blanc viscéral.

(A) Expression génique de l'Haptoglobine (Hp) après un traitement à l'H2O2 sur de la FSV de souris différenciée en adipocytes. **(B)** Sécrétion de l'Hp après un traitement à l'H2O2 sur de la FSV de souris différenciée en adipocytes. **(C)** Expression génique de marqueurs du cycle cellulaire en fonction des traitements à l'Hp sur de la FSV de souris différenciée en adipocytes. **(D)** Expression protéique de p16 et p53 sur 3T3F442A traitées pendant 3 jours à 1µM ou 2µM d'Hp. **E-F** Expression génique de marqueurs de sénescence **(E)** et d'inflammation **(F)** dans le tissu adipeux blanc viscéral. **(G)** Expression génique de gènes du métabolisme dans le tissu adipeux blanc viscéral. Datas sont les moyennes means ± s.e.m. *p<0,05 ; **p<0,01 ; ***p<0,001. Test de

Les principaux rôles abordés dans ce manuscrit sont illustrés en **Figure 14**.

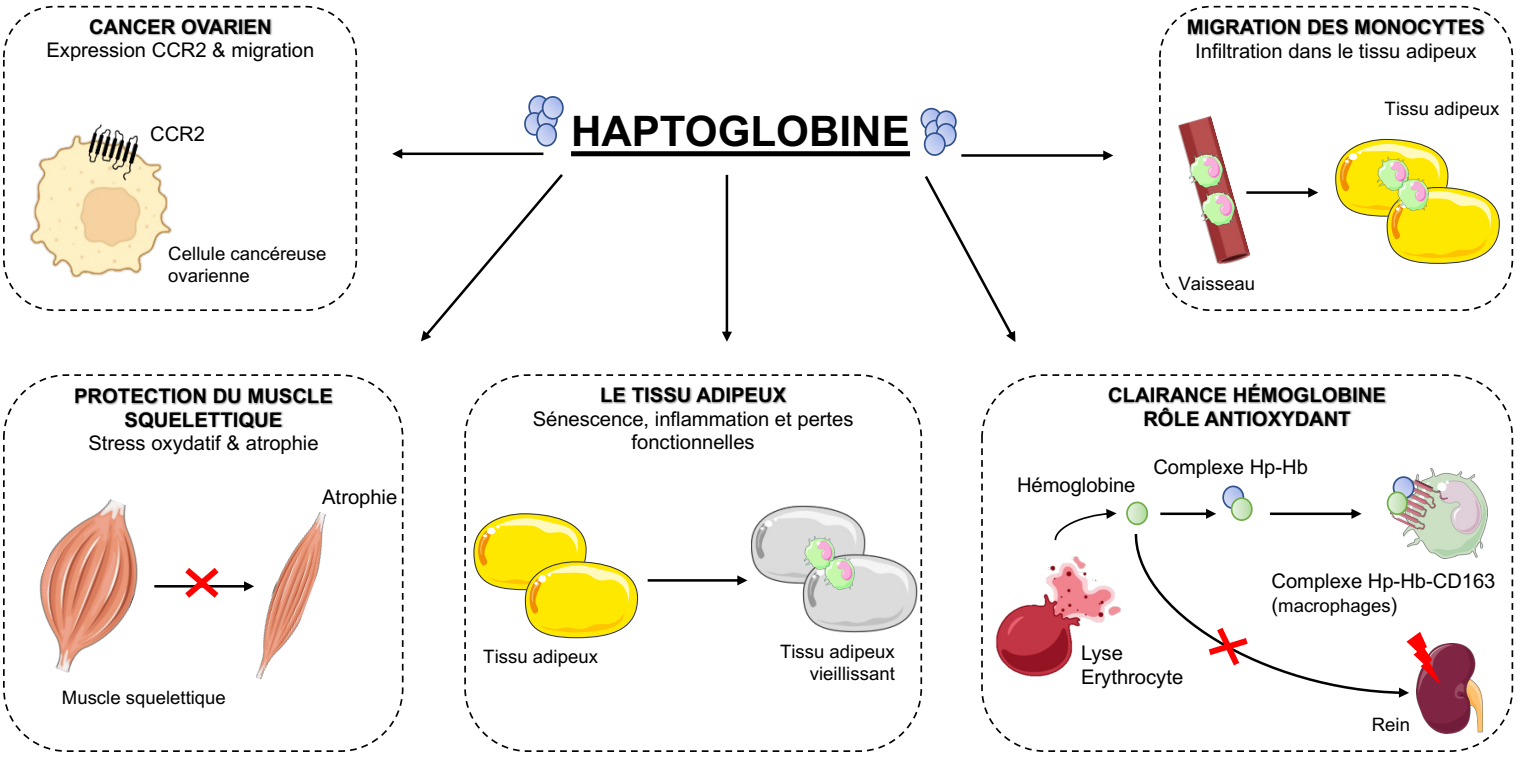


Figure 14 : Les différents rôles de l'haptoglobine au sein de l'organisme

●●●

HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS DE TRAVAIL

●●●

Cette revue de la littérature fait état de toutes les causes relatées à l'apparition de la sarcopénie et des défauts de la régénération musculaire. Différentes approches thérapeutiques pour cette pathologie ont vu le jour mais elles ont, pour la plupart, été abandonnées. Aujourd'hui, il est donc essentiel et crucial de trouver de nouveaux biomarqueurs conduisant à de nouvelles stratégies thérapeutiques afin de ralentir l'apparition et le développement de cette pathologie. Pour cela, le tissu adipeux pourrait devenir un bon candidat d'étude puisque, *via* ses sécrétions altérées au cours du vieillissement, il peut impacter différents organes.

Une précédente étude réalisée au sein de mon laboratoire montre une augmentation de l'haptoglobine dans le plasma et le tissu adipeux des souris âgées. Étant donné le rôle décrit de cette glycoprotéine sur le muscle squelettique dans la littérature par Maffei et ses collaborateurs en 2015, l'haptoglobine semble être un bon candidat d'étude. Nous avons donc cherché à comprendre la communication entre ces deux organes pendant la sarcopénie et plus précisément le rôle de l'haptoglobine dans les altérations des capacités de régénération musculaire.

C'est ainsi que mon projet de thèse s'est articulé autour de trois axes :

1) **Étudier les conséquences d'une augmentation systémique d'haptoglobine sur la cellule mature du muscle squelettique : la fibre musculaire**

Dans le but d'étudier les conséquences d'une augmentation systémique d'haptoglobine sur les fibres musculaires du muscle squelettique, nous avons décidé de mimer l'augmentation plasmatique d'haptoglobine chez des souris C57Bl6J âgées de 3 et 12 mois de manière à reproduire des taux circulants similaires à des souris âgées respectivement de 12 et 24 mois et d'analyser les conséquences fonctionnelles, morphologiques et géniques sur la fibre mature musculaire.

2) **Étudier les conséquences d'une augmentation systémique d'haptoglobine sur les cellules responsables du processus de régénération musculaire**

Dans ce deuxième objectif, nous avons également mimé cette augmentation d'haptoglobine et étudié son impact lors d'une régénération musculaire induite par une injection de cardiotoxine. Pour l'analyser, des études fonctionnelles, morphologiques

et géniques ont été réalisées. Ensuite grâce à des modèles *in vitro* de culture primaire de cellules satellites ou de culture de lignée musculaire murine C2C12, nous avons investigué son rôle direct sur la cellule myogénique dans différentes phases (prolifération, *commitment* et différenciation).

●●●

MATÉRIELS ET MÉTHODES

●●●

Animaux :

Les souris sont hébergées en accord avec les principes et directives de l'institut médical de la recherche et ont été approuvées par un comité d'éthique (US006/CREFRE, CEEA-122 INSERM). Les souris Wild-Type (= WT) de fond génétique C57Bl6/J de 3 à 24 mois sont fournies par le Laboratoire Janvier (St-Berthevin, France). Les animaux sont hébergés dans une salle à température (20-22°C) et humidité (50-60%) constantes avec un cycle de lumière jour-nuit de 12-12h et un accès libre à l'eau et la nourriture. Les souris ont été exclues si elles mouraient prématurément ou si elles présentaient des tumeurs après nécropsie. Toutes les souris ont reçu un régime alimentaire normal. Toutes les souris ont été mises à mort par dislocation cervicale, dans un état nourri. Lors du prélèvement d'organes, les différents tissus adipeux (le tissu adipeux blanc sous-cutanée et le tissu adipeux blanc viscéral), le sang et les différents muscles (le Gastrocnémius, le tibialis antérieur, le vaste lateralis, un abdominal, le triceps, le soléus, *l'Extensor digitorum longus* (=EDL)) ont été prélevés pour les différentes études.

Traitement des animaux :

i) *Pour le protocole chronique de 28 jours :*

Les souris C57Bl6/J âgées de 3, 12 et 24 mois ont été randomisées dans les différents groupes, en fonction de leur poids et ont reçu une injection en sous-cutanée d'haptoglobine (Sigma, H3536-5mg) à une dose de 10μg/100μL/48heures pour les souris âgées de 3 mois et une dose de 25μg/100μL/48heures pour les souris âgées de 12 mois, pendant 28 jours. Des souris témoins appariées selon l'âge ont été injectées avec du PBS (= véhicule). Toutes les souris ont été euthanasiées 30 minutes après la dernière injection d'haptoglobine ou de PBS.

ii) *Pour le protocole de régénération de 14 jours :*

Les souris C57Bl6/J âgées de 3 et 12 mois ont été randomisées dans les différents groupes, en fonction de leur poids et ont reçu une injection quotidienne en sous-cutanée d'haptoglobine (Sigma, H3536-5mg) à une dose de 10μg/100μL/24heures pour les souris âgées de 3 mois et une dose de 25μg/100μL/24heures pour les souris âgées de 12 mois, pendant 14 jours. Des souris témoins appariées selon l'âge ont été injectées avec du PBS (= véhicule). Toutes les

souris ont été euthanasiées 30 minutes après la dernière injection d'haptoglobine ou de PBS.

Histologie des muscles :

Les muscles ont été congelés dans de l'isopentane refroidi grâce à de l'azote liquide et stockés à -80°C. Les muscles ont été ensuite coupés au cyrostat à 7μm et les coupes ont été marquées à l'hématoxyline/éosine après la fixation avec 4% de PFA. Les coupes ont été finalement montées avec des lamelles puis séchées à l'air libre. L'aire des myofibres a été déterminée sur toute la section. La taille des fibres avec un noyau central a également été calculée sur toute la section. Les mesures ont été réalisées grâce à un algorithme de traitement automatique des images.

Expression protéique :

Les échantillons de plasma ont été dilués dans du PBS 1X. Les muscles et les cellules ont été lysés (Precellys 24, Ozyme, France – pour les muscles). Après la réalisation d'un dosage, les échantillons ont été chargés sur des gels SDS-PAGE 4-20% et transférés sur une membrane de nitrocellulose (GE Healthcare, Life Science, Whatman). Les membranes ont été bloquées puis mises en présence des anticorps primaires anti-Haptoglobine (Abcam, ab231000), p-p38-MAPK (cell signaling, 9211), p38-MAPK (cell signaling, 9212S) puis en présence des anticorps secondaires anti-Rabbit (cell signaling). Les protéines immunoréactives ont été détectées à l'aide du substrat Clarity Western ECL (BioRad, #1705060) et quantifiées à l'aide du logiciel ImageLab (BioRad).

Expression génique :

L'ARN total a été isolé des cellules ou des différents organes en utilisant le kit de purification d'ARN GeneJet (K0732, Fermentas Thermo-Scientifc). La transcription reverse de ces ARN a été faite en utilisant un kit contenant des hexamères, des DNTPs et la reverse transcriptase Superscript II (MultiScribe, Applied Biosystem, ThermoFisher, 4374967). La PCR en temps réel a été réalisée avec 250 à 500 ng d'ARN, des oligonucléotides sens et antisens dans un volume final de 10µl dans une plaque 384 puits en utilisant le mix PCR Mesablue (Eurogentec, RT-SY2X-03+WOUB). La normalisation des gènes a été effectuée grâce à l'expression du gène

de ménage 36B4, gène qui code pour une phosphoprotéine ribosomique qui forme une association avec la plus petite sous-unité du ribosome (40S).

Injection de cardiotoxine :

Les souris ont été traitées, 30 minutes avant la lésion musculaire, avec une injection d'haptoglobine en sous-cutanée (10μg/100μL) et une injection en intrapéritonéal de buprénorphine (Centravet, 0,1mg/kg). L'injection de buprénorphine a également été faite le jour suivant la lésion musculaire. Le jour de la lésion musculaire, les souris ont été anesthésiées par inhalation d'isoflurane et les membres postérieurs ont été rasés. Ensuite, 10μM de cardiotoxine (CDX, Latoxan, n°L8102) ont été injectés en deux injections de 25μL dans le muscle *tibialis anterior* gauche et en deux injections de 50μL dans le muscle *gastrocnemius* gauche, à l'aide de seringue à insuline, 30G. Les souris ont ensuite été euthanasiées à 2, 7 ou 14 jours après l'injection de cardiotoxine, par dislocation cervicale et les muscles contrôles ou lésés ont été récupérés pour les différentes analyses.

Force spécifique dans le *gastrocnémius* (contraction *in situ*) :

Les souris ont été anesthésiées avec une injection intrapéritonéale de pentobarbital (0,1mg/g de poids corporel ; CEVA France). Le tendon distal du *gastrocnémius* a été isolé des autres muscles entourés, coupé et lié avec un fil de nylon à un capteur de force (500g, AD instruments, France). Le capteur de force est relié au système PowerLab (26 T, AD Instruments) et la mesure a été réalisée à l'aide du logiciel LabChart 4 (AD Instruments). Une électrode bipolaire a été placée sur le nerf sciatique isolé et est reliée également au système PowerLab. La capacité de génération de la force a été évaluée en mesurant la force générée en réponse à une contraction isométrique électrique à une fréquence de 100Hz (train de stimulation 200 millisecondes). La force isométrique à 100Hz a été déterminée à L0 (= longueur à laquelle la tension maximale a été obtenue).

La résistance à la fatigue a été déterminée après une période de repos de 2 minutes. Le nerf sciatique a été stimulé à 30Hz pendant 500 millisecondes toutes les 2 secondes jusqu'au retour à la normale de la force (proche de 0). Toutes les contractions ont été réalisées à la longueur initiale L0.

Explorations fonctionnelles du muscle squelettique :

i) *Mesure de la force musculaire par Grip test* :

Les souris ont dû saisir une grille horizontale reliée à un dynamomètre avec les quatre membres et ont été tirées en arrière quatre fois. La force appliquée à la grille (= force de préhension) à chaque fois avant que l'animal ne perde sa prise a été enregistrée en Newton. La moyenne des quatre mesures est normalisée par rapport au poids du corps entier de chaque souris.

ii) *Mesure de la force musculaire par le test de distribution pondérale cinétique (= Kinetic Weight Bearing – KWB)* :

Pour évaluer le comportement et la force spécifique dans chaque patte, le test du Kinetic Weight Bearing (= KWB) a été utilisé. Des capteurs de pression ont été reliés à un tapis permettant la mesure de différents paramètres dans chaque patte de l'animal pendant la séquence de marche, tandis qu'une caméra intégrée détecte la forme du corps et le centre de gravité de l'animal. Les souris se déplacent librement sur le tapis. Les animaux ont été entrainés à marcher dans le couloir (150mm x 550mm x 35-85mm) avant l'expérience. Les mesures ont été faites à 1, 6, et 13 jours après lésion musculaire. La collection des datas par souris a été terminées quand 5 runs validés ont été obtenus ou après 5 minutes d'acquisition. La moyenne de tous les runs collectés pour chaque animal a ensuite été calculée. Si une souris n'a pas marché durant le run, elle a été exclue lors de l'analyse. Le nombre de souris peut donc varier.

iii) *Mesure de la résistance musculaire par Grille inversée* :

Les souris ont été placées au centre du système de grille métallique et la grille a été tournée en position inversée pendant 2 secondes, la tête de la souris étant inclinée en dernier. La grille était maintenue de manière stable à 40-50 cm au-dessus d'une surface rembourrée. La capacité d'agrippement de la grille a été déterminée par le temps que les souris ont passé accrochées à la grille. La mesure a été effectuée deux fois et la moyenne des deux mesures est normalisée par rapport au poids du corps entier de l'animal.

iv) Mesure de l'équilibre par Rotaroad :

La coordination motrice et l'équilibre ont été évalués avec le test du rotarod en accélération. Les souris ont été placées sur le système (BioSeb) avec une rotation à vitesse constante de 4rpm pendant 5 minutes avant la mesure. Pour le test d'accélération (de 4-40rpm toutes les 600 secondes), deux tests par souris ont été réalisés 13 jours après l'injection de cardiotoxine, avec 15 minutes d'intervalle entre chaque test. Le temps jusqu'à ce que les souris tombent de la tige a été enregistré.

v) Mesure de la nociception :

Le seuil de retrait des pattes a été mesuré chez des souris âgées de 3 et 12 mois traitées avec un véhicule ou de l'haptoglobine en utilisant, de manière croissante, les filaments de Von Frey 0,16 à 1,4g. Les souris ont été placées dans des chambres posées au-dessus d'une grille métallique et ont pu s'acclimater à l'appareil pendant 20-30 minutes avant les expériences. Les filaments de Von Frey ont été pressés contre la surface planaire de la patte lésée jusqu'à ce que le filament se déforme et est maintenu pendant un maximum de 3 secondes. La mesure pour un même filament a été réalisée 15 fois (5 tests de 3 mesures, avec 5 minutes entre chaque test). Une réponse positive était notée par un retrait brusque de la patte ou un lèchement de la part de l'animal sur la patte stimulée. Les tests ont commencé du filament ayant le plus petit numéro et ont progressé selon une méthode de haut en bas.

Digestion des muscles et cytométrie en flux :

Les muscles ont été récoltés pendant le sacrifice et digérés après avoir été finement coupés avec des enzymes Collagénase B (Roche, 11088815001), Dispase II (Roche – 04942078001). Après plusieurs digestions et centrifugations, les tubes ont été filtrés sur des tamis de 100µm dans un premier temps, puis sur des tamis de 70µm. Une fois la filtration effectuée, les cellules ont été centrifugées.

Une fois la digestion finie et le comptage effectué, 300 000 cellules ont été réparties et marquées avec du Live/Dead pendant 30 minutes, à 4°C et à l'abri de la lumière. Ensuite, les cellules ont été marquées avec le mix d'anticorps pendant 30 minutes, à 4°C et à l'abri de la lumière. A la fin du protocole, les cellules ont été reprises dans du tampon FACS (PBS, 10% SVF et EDTA 2mM).

Culture primaire de cellules satellites isolées et traitement :

Les cellules ont ensuite été triées avec un ARIAFusion selon cette stratégie : $CD45^-$, $CD31^-$, $CD11b^-$, $Sca1^-$, α7-intégrine$^+$. Après tri, 30 000 cellules ont été placées dans un milieu de prolifération (Ham's F10, 20% SVF, 1%P/S, 5ng/mL de FGF2), dans un puit d'une plaque de 24 puits (TPP – 92024), préalablement coaté collagène (354236 – Corning). Les cellules ont été maintenues en prolifération pendant 7 jours. Au 7^{ième} jour, 200μL de trypsine a été ajoutée et les cellules ont été mises à 37°C pendant quelques minutes. 800μL de milieu de prolifération est ajouté et les cellules ont été réparties de la façon suivante : 5000 cellules pour la prolifération et 15000 cellules pour la différenciation dans des plaques 96 puits, coatés collagène. La prolifération a duré 6 jours et la différenciation complète 11 jours.

Les cellules ont été traitées avec trois doses d'haptoglobine (5μM, 1μM et 0,1μM) ou un véhicule (= eau stérile).

Pour la phase de prolifération, les cellules ont été traitées le lendemain de l'ensemencement et tous les deux jours, pendant les 6 premiers jours de la culture.

Pour la phase de différenciation, à la fin de la prolifération, les cellules ont été mises dans un milieu de différenciation (2% Horse Sérum, 1% P/S et DMEM High glucose). Les cellules ont été traitées pendant les 4 premiers jours de cette phase pour la différenciation dite précoce et pendant toute la différenciation pour la différenciation dite tardive. Les cellules ont ensuite été récoltées soit pour de l'ARN, de la protéine ou du marquage.

A la fin des différents traitements, les cellules sont ensuite arrêtées pour différentes études (génique, protéique et cytochimique).

Culture de la lignée murine C2C12 et traitement à l'haptoglobine :

Les cellules C2C12 ont été décongelées puis mises dans une boite de pétri 100mm pendant 3 jours dans un milieu de prolifération (DMEM High glucose (Sigma – D6429), 10% SVF et 1% P/S). Une fois les cellules à 70-80% de confluence, celles-ci ont été passées et mises en culture à une confluence de 30 000 cellules par mL, dans des plaques 6 puits (TPP – 92006). De la même manière que pour la culture primaire de cellule satellites, un traitement à l'haptoglobine à une concentration de

1μM a été réalisé pendant la phase de prolifération, la différenciation précoce ou la différenciation tardive.

Traitement des cellules murine C2C12 :

Concernant les cellules C2C12 deux puits sont traités avec de l'haptoglobine à une dose de 1μM et deux puits sont traitées avec de l'eau stérile (puits contrôles). Différents traitements ont été appliqués :

Traitement pendant la phase de prolifération : le lendemain de la mise en plaque, le traitement des cellules a été effectué tous les deux jours, pendant 4 jours, avec de l'haptoglobine ou un véhicule (= eau stérile). A la fin des 4 jours de traitement, les cellules sont ensuite arrêtées pour une étude génique.

Traitement pendant les premières phases de différenciation : après la phase de prolifération d'environ 4 jours, les cellules sont mises dans un milieu de différenciation (DMEM High glucose, 10% Horse Sérum). Les cellules ont reçu les deux traitements pendant les deux premiers jours de la différenciation. A la fin des deux jours de traitement, les cellules ont ensuite été arrêtées pour différentes études (génique, protéique et cytochimique).

Traitement pendant toute la phase de différenciation : après la phase de prolifération d'environ 4 jours, les cellules sont mises dans un milieu de différenciation (DMEM High glucose, 10% Horse Sérum) pendant six jours. Les cellules ont reçu les trois traitements pendant toute la phase de différenciation. Le milieu a été changé tous les deux jours. A la fin du traitement, les cellules ont ensuite été arrêtées pour différentes études (génique, protéique et cytochimique).

Marquage pour l'index de fusion :

Les cellules ont été fixées avec 4% de PFA puis marquées avec du DAPI dilué au 1/10000, pendant 10 minutes. Une fois les puits rincés, plusieurs photos de chaque puits ont été réalisées avec le microscope Ti-E champ large de NIKON et une analyse manuelle a été réalisée. L'index de fusion est calculé en mesurant le nombre de noyaux dans chaque myotube / le nombre de noyau total.

Mesure de la prolifération :

Par la technique du Cell Trace Violet : Les cellules ont été mises en suspension et marquées avec 100 µL d'une solution de 10 µM de CellTrace Violet (Life Technologies) pendant 5 min à température ambiante (= RT). Par la suite, les cellules ont été lavées trois fois avec du PBS et mises en culture dans des plaques 6 puits (TPP – 92006). Chaque jour et pendant 4 jours, les cellules ont été décollées, centrifugées et mises dans du tampon FACS pour mesurer la moyenne de fluorescence du colorant par cytométrie en flux.

Par la technique de l'incucyte : Les cellules ont été ensemencées dans des plaques 6 puits (TPP – 92006) et mis dans l'incucyte (Incucyte S3). Ce microscope est positionné dans un incubateur et permet de photographier les différents puits d'intérêts pendant un temps donné. Une photo a été prise toutes les 6 heures et une analyse de la confluence a été réalisée par le logiciel.

Liste des primers qPCR Eurogenetec :

	Primer sens	Primer antisens
Pax7	TCCCTCCAACCACATGAACC	GGATGCTCATGACCTGAGGAG
eMyHC	CTGCCCCTCACACCCTATC	CCGAGGTTTCAGCTATGGAGC
Myf5	ACGGCATGCCTGAATGTAACA	AAAGCTGCTGTTCTTTCGGGA
MyHC3	TCCGACTTGCGGAGGAAAG	ACAGTCAGAGGTGTGACTCAGC
MyoD	ATGGCATGATGGATTACAGCG	GGTGTCGTAGCCATTCTGCC
Myogenine	ACCCAGGAGATCATTTGCTCG	GTAAGGGAGTGCAGATTGTGGG
Atrogin-1	CTTTCAACAGACTGGACTTCTCGA	CAGCTCCAACAGCCTTACTACGT
MuRF1	GTTTGACACCCTCTACGCCA	TCAGAGCCTCGATGAAGCC
MyHC1	TGAGCTGAAGACCAAGGAGGA	TGGCGTGAGTATTCACCTGAC
p16	GGCATAGCTTCAGCTCAAGCA	CTGAGGCCGGATTTAGCTCTG
p21	GCGCAGATCCACAGCGA	CACTTTGCTCCTGTGCGGA
p53	AGGAAGTCCTTTGCCCTGAAC	AGAGGCGCTTGTGCAGGT
Coll I	TGTGTGCGATGACGTGCAAT	GGGTCCCTCGACTCCTACA

Coll III	AAGGCGAATTCAAGGCTGAA	TGTGTTTAGTACAGCCATCCTCTAGAA
TGF-β	GAGCCCGAAGCGGACTACTA	CACTGCTTCCCGAATGTCTGA
36B4	AGTCGGAGGAATCAGATGACGAT	GGCTGACTTGGTTGCTTTGG

Liste des anticorps de cytométrie en flux et tri cellulaire :

Anticorps	Fournisseur & référence
CD45 – PeCya7	BD Bioscience – 552848
F4/80 – BV650	BD Bioscience – 743282
CD11b – PE	BD Bioscience – 557397
CD86 – BV785	BD Bioscience – 740900
CD80 – PeVio615	Miltenyi – 130-116-467
CD163 – AF700	
CD206 – PerCP	eBioscience – 46-2069-41
CCR2 – APC	Miltenyi – 130-119-658
Gr1 – BV510	Biolegend – 127633
CD45 – PerCP	BD Bioscience – 552848
CD31 – APC	BD Bioscience – 551262
CD11b – APC	BD Bioscience – 553312
Sca_1 – PerCP	Fisher – 15391200
α_7-integrin – AF 700	Biotechne – FAB3518N

●●●

RÉSULTATS

●●●

A. Conséquences de l'augmentation de l'haptoglobinémie sur la fibre mature musculaire au cours du vieillissement

Comme évoqué en introduction, des résultats préliminaires obtenus au laboratoire ont montré que l'haptoglobinémie augmentait au cours du vieillissement. Afin de confirmer ce résultat, nous avons dosé par western blot les taux d'haptoglobine plasmatiques chez des souris âgées de 3, 12 et 24 mois et nous avons observé une augmentation dans le plasma des souris âgées de 24 mois par rapport aux souris de 3 et 12 mois (**Figure 1A-B**). Dans un deuxième temps, afin de savoir si l'haptoglobine pouvait jouer un rôle sur le muscle squelettique, nous avons voulu étudier l'évolution de l'expression génique du système récepteur CD163/CCCR2-Haptoglobine au cours du vieillissement dans plusieurs muscles squelettiques dont le *gastronemius*, le *tibialis anterior*, le *soleus*, le Exte*nsor digitorum longus*, le triceps et le *vaste lateralis*. Comme le montre la **Figure 1C**, nous avons observé une expression similaire des récepteurs CD163, CCR2 et de l'haptoglobine, quel que soit l'âge de la souris dans le muscle gastrocnémius (**Figure 1C**). Les résultats obtenus sur les autres muscles étant similaires aux résultats sur le *gastrocnemius* (résultats non montrés), nous avons choisi de concentrer notre attention sur le muscle *gastrocnemius* qui est un muscle de la locomotion (donc affecté au cours du vieillissement) et composé de fibres glycolytiques et oxydatives (donc un muscle mixte, représentatif des principaux muscles locomoteurs de l'organisme).

Ainsi, afin de mieux appréhender l'impact de l'augmentation plasmatique d'haptoglobine observée au cours du vieillissement sur la fibre musculaire mature, nous avons mimé pharmacologiquement cette augmentation plasmatique chez des souris âgées de 3 et 12 mois. Pour cela, nous les avons traitées pendant 28 jours, avec une solution d'haptoglobine à 10μg/souris/48heures pour les souris de 3 mois et à 25μg/souris/48heures pour les souris âgées de 12 mois (**Figure 1D et 1L**). Ces doses ont été choisies en analysant les taux observés chez les souris de 12 et 24 mois respectivement afin de reproduire cette hyperproduction d'haptoglobine associée au vieillissement. Cependant, nous avons bien conscience que cette supplémentation pharmacologique systémique ne mime pas pour autant la surproduction d'haptoglobine au niveau du tissu adipeux blanc observée au cours du vieillissement.

D’autres expériences ciblant ce tissu seront proposées par la suite. L’analyse du plasma des souris traitées nous montre tout d’abord que les souris âgées de 3 et 12 mois présentaient une augmentation physiologique de l’haptoglobine plasmatique d’environ trois fois par rapport à leur contrôle du même âge (**Figure 1E-F, 1M-N**). Par conséquent, nous avons par la suite pu évaluer son impact sur les fonctions musculaires et sur la myogenèse.

Ainsi, nous avons pu observer, chez des souris âgées de 3 mois, que le traitement chronique à l’haptoglobine ne semblait pas affecter la force (**Figure 1G**), la résistance (**Figure 1H**), l’expression des gènes impliqués dans la myogenèse dite précoce et tardive (**Figure 1I-J**) dans la sénescence et l’atrophie (résultats non montrés) ainsi que dans la surface des fibres (**Figure 1K**). Ces résultats sont également observés chez la souris âgée de 12 mois (**Figure 1O-S**).

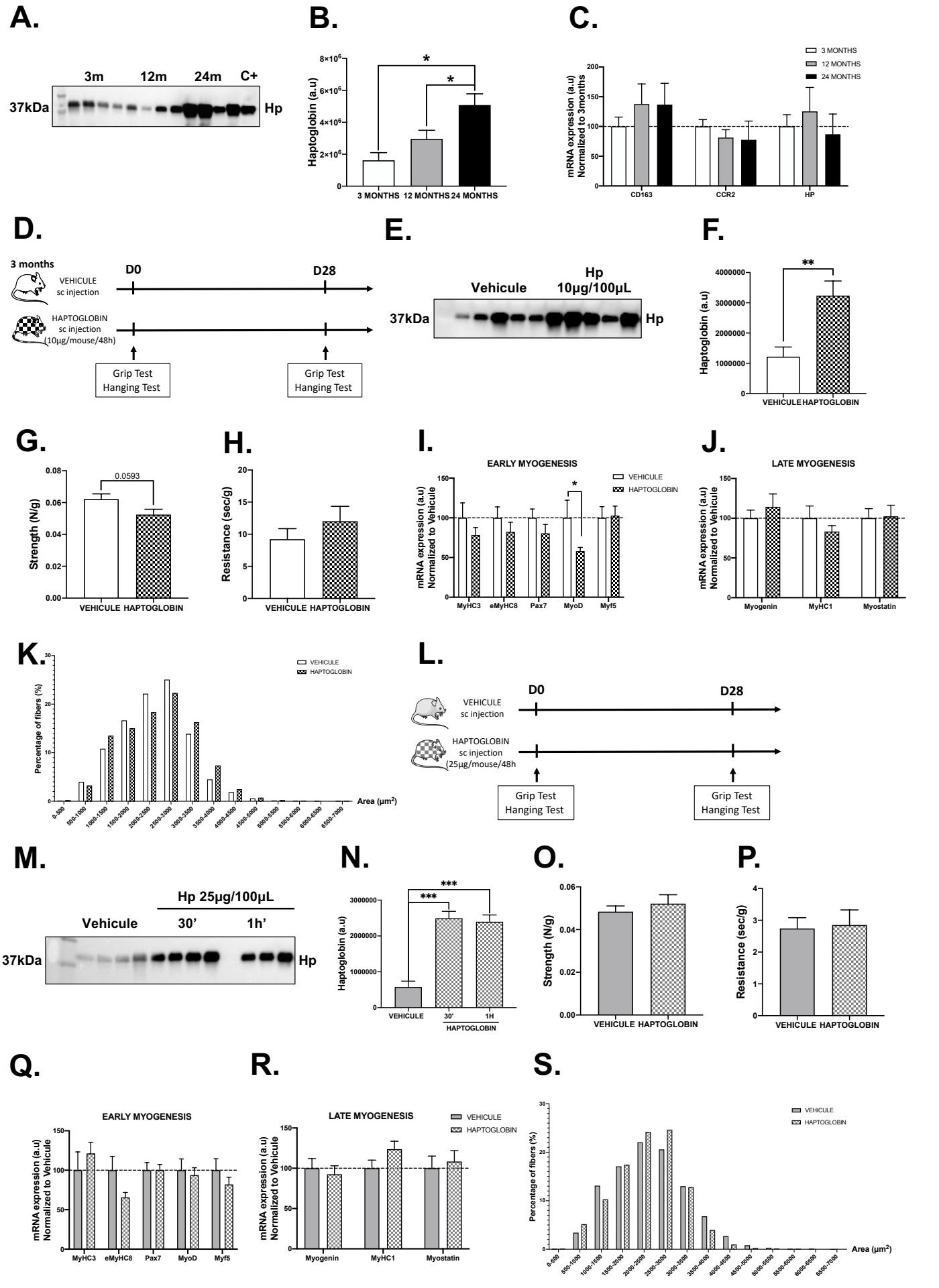

A.
3m
12m
24m
C+
37kDa
Hp
B.
Haptoglobin (a.u)
3 MONTHS
12 MONTHS
24 MONTHS
C.
3 MONTHS
12 MONTHS
24 MONTHS
mRNA expression (a.u)
Normalized to 3months
CD163
CCR2
HP
D.
3 months
VEHICULE
sc injection
HAPTOGLOBIN
sc injection
(10µg/mouse/48h)
D0
D28
Grip Test
Hanging Test
Grip Test
Hanging Test
E.
Vehicule
Hp
10µg/100µL
37kDa
Hp
F.
Haptoglobin (a.u)
VEHICULE
HAPTOGLOBIN
G.
Strength (N/g)
0.0593
VEHICULE
HAPTOGLOBIN
H.
Resistance (sec/g)
VEHICULE
HAPTOGLOBIN
I.
EARLY MYOGENESIS
VEHICULE
HAPTOGLOBIN
mRNA expression (a.u)
Normalized to Vehicule
MyHC3
eMyHC8
Pax7
MyoD
Myf5
J.
LATE MYOGENESIS
mRNA expression (a.u)
Normalized to Vehicule
Myogenin
MyHC1
Myostatin
K.
VEHICULE
HAPTOGLOBIN
Percentage of fibers (%)
Area (µm²)
L.
VEHICULE
sc injection
HAPTOGLOBIN
sc injection
(25µg/mouse/48h
D0
D28
Grip Test
Hanging Test
Grip Test
Hanging Test
M.
Hp 25µg/100µL
Vehicule
30'
1h'
37kDa
Hp
N.
Haptoglobin (a.u)
VEHICULE
30'
1H
HAPTOGLOBIN
O.
Strength (N/g)
VEHICULE
HAPTOGLOBIN
P.
Resistance (sec/g)
VEHICULE
HAPTOGLOBIN
Q.
EARLY MYOGENESIS
mRNA expression (a.u)
Normalized to Vehicule
MyHC3
eMyHC8
Pax7
MyoD
Myf5
R.
LATE MYOGENESIS
VEHICULE
HAPTOGLOBIN
mRNA expression (a.u)
Normalized to Vehicule
Myogenin
MyHC1
Myostatin
S.
VEHICULE
HAPTOGLOBIN
Percentage of fibers (%)
Area (µm²)

Figure 1 : L'haptoglobine n'impacte pas la fibre mature musculaire lors d'un traitement chronique de 28 jours.
(A) Western Blot de l'haptoglobine (Hp) dans le plasma de souris âgées de 3, 12 et 24 mois (n=4 par groupe). **(B)** Quantification du Western Blot de l'haptoglobine (Hp) par analyse densitométrique dans le plasma de souris âgées de 3, 12 et 24 mois (n=5 à 7 par groupe). **(C)** Expression des gènes CD163, CCR2 et Hp dans le *gastrocnemius* chez des souris âgées de 3, 12 et 24 mois (n=8 par groupe). **(D)** Protocole chez de souris âgées de 3 mois de traitement à l'haptoglobine et des tests fonctionnelles effectuées pendant 28 jours. **(E)** Western Blot de l'Hp dans le plasma de souris âgées de 3 mois traitées par un véhicule ou de l'Hp après 24 heures de traitement (n=5 par groupe). **(F)** Quantification du Western Blot l'Hp par analyse densitométrique du plasma de souris âgées de 3 mois traitées par un véhicule ou de l'Hp après 24 heures de traitement (n=5 par groupe). **G-H** Force par grip test **(G)** et capacité d'agrippement **(H)** évalués sur des souris âgées de 3 mois traitées par un véhicule ou de l'Hp pendant 28 jours (n=7 à 8 par groupe). **I-J** Expression génique de la myogenèse précoce **(I)** et de la myogenèse tardive **(J)** dans le *gastrocnemius* chez des souris âgées de 3 mois traitées par un véhicule ou de l'Hp pendant 28 jours (n=7 à 8 par groupe). **(K)** Distribution de l'aire des fibres chez des souris âgées de 3 mois traitées par un véhicule ou de l'Hp pendant 28 jours. **(L)** Protocole chez de souris âgées de 12 mois de traitement à l'haptoglobine et des tests fonctionnelles effectuées pendant 28 jours. **(M)** Western Blot de l'Hp dans le plasma de souris âgées de 12mois traitées par un véhicule ou de l'Hp après 30 minutes et 1 heure de traitement (n= 4 par groupe). **(N)** Quantification du Western Blot l'Hp par analyse densitométrique du plasma de souris âgées de 12 mois traitées par un véhicule ou de l'Hp après 30 minutes ou 1 heure de traitement (n= 4 par groupe). **O-P** Force par grip test **(O)** et capacité d'agrippement **(P)** évalués sur des souris âgées de 12 mois traitées par un véhicule ou de l'Hp pendant 28 jours (n=8 par groupe). **Q-R** Expression génique de la myogenèse précoce **(Q)** et de la myogenèse tardive **(R)** dans le *gastrocnemius* chez des souris âgées de 12 mois traitées par un véhicule ou de l'Hp pendant 28 jours (n=8 par groupe). **(S)** Distribution de l'aire des fibres chez des souris âgées de 12 mois traitées par un véhicule ou de l'Hp pendant 28 jours. Datas sont les moyennes means ± s.e.m. *p<0,05 ; ***p<0,001. Test de student.

On peut donc conclure avec cette étude que l'hyperhaptoglobinémie n'impacte pas les fonctions du muscle mature chez des souris âgées de 3 et 12 mois. Cette absence d'effet nous a contraint à modifier notre hypothèse. De plus, la présence du récepteur à l'haptoglobine CCR2 sur les cellules satellites pendant une régénération ainsi que la présence des deux récepteurs sur les cellules inflammatoires (cellules dont la présence est essentielle à la régénération musculaire) nous ont conduit à investiguer le rôle de cette glycoprotéine sur les processus de régénération musculaire.

B. Conséquences de l'augmentation de l'haptoglobinémie sur les processus de régénération au cours du vieillissement

1. Effets de l'haptoglobine sur la fonction musculaire lors d'une régénération musculaire chez la souris âgée de 3 mois

Comme expliqué dans l'introduction de ce manuscrit de thèse, le muscle squelettique est un tissu possédant une grande capacité de régénération grâce, entre autres, aux cellules satellites. Au cours du vieillissement, ce mécanisme est altéré dû à une diminution du nombre[258] et une géro-conversion[262] des cellules satellites. Il a également été remarqué une diminution des marqueurs de la myogenèse[266] et des altérations au niveau des voies de signalisation[272,275,276]. Les différentes et récentes découvertes nous ont amené à nous questionner sur le rôle potentiel de l'haptoglobine dans ce processus. C'est ainsi que nous avons étudié le rôle de l'haptoglobine sur la régénération musculaire induite par une injection intra-musculaire de cardiotoxine (= CDX). Cette toxine permet de dépolariser la membrane plasmique des fibres musculaires, laissant intactes les cellules satellites, activées qui vont permettre la régénération musculaire (Cf. introduction). Nous avons injecté la cardiotoxine par voie intramusculaire dans le *gastrocnemius* chez des souris âgées de 3 mois. La moitié des souris ont été traitées par le véhicule (= PBS) et l'autre moitié par de l'haptoglobine (10μg/souris/jour) au moment de l'injection de cardiotoxine et pendant les 14 jours du processus régénératif. Enfin, la cinétique de reconstruction a été étudiée à 2, 7 et 14 jours après la lésion (**Figure 2A**). Les injections de cardiotoxine ont été également réalisées dans le *tibialis antérior*. Les premiers résultats quant aux effets de l'haptoglobine pendant une régénération musculaire étant équivalents, nous avons décidé de concentrer notre étude sur un seul muscle squelettique : le *gastrocnémius*.

Dans un premier temps, nous avons étudié la fonction musculaire grâce à différents tests. Nous avons ainsi mesuré l'équilibre de nos souris grâce au rotarod. Cette mesure, dépendante des muscles squelettiques, est diminuée avec le vieillissement. Le traitement à l'haptoglobine ne semble pas affecter les capacités d'équilibre de nos souris après une régénération musculaire induite par la cardiotoxine (**Figure 2B**). Dans un second temps, nous avons mesuré la fonction des muscles lésés de manière générale en évaluant la force dans toutes les pattes de la souris grâce au test d'agrippement puis de manière plus spécifique en évaluant la force intrinsèque du

muscle lésé après une stimulation du nerf sciatique. Étant donné que la force générale, mesurée grâce au test d'agrippement, n'est pas impactée par un traitement à l'haptoglobine lors de la régénération musculaire (**Figure 2C**), nous avons réalisé le test du Kinetic Weight Bearing (= KWB). Ce test permet de mesurer, plus précisément, différents paramètres comme la force musculaire, la surface d'appui dans chaque patte ou encore la vitesse de marche. De cette manière, nous avons pu mesurer la surface d'appui et la force spécifiquement dans la patte injectée par la cardiotoxine (= patte RL) (**Figure 2D et 2E**). Comme observé dans la **Figure 2D**, les souris traitées à l'haptoglobine ont une diminution de la surface d'appui 2 jours après la lésion par la cardiotoxine alors que la force, elle, est diminuée 6 jours après (**Figure 2E**). De plus, comme la douleur peut impacter les résultats obtenus avec le KWB lors d'une régénération musculaire, nous avons voulu nous assurer qu'un traitement à l'haptoglobine n'affectait pas cette composante, grâce au test de filament de Von Frey. Comme le montre la **Figure 2F**, les souris traitées à l'haptoglobine ne sont pas plus sensibles à la douleur, comparées à des souris contrôles traitées par le véhicule. Enfin, pour finir d'explorer le rôle de l'haptoglobine sur la fonction musculaire, nous avons mesuré la force intrinsèque du muscle lésé en étudiant la force développée après une stimulation électrique (100Hz, 30V, 1ms) ainsi que la force tétanique qui représente la capacité de résistance des fibres musculaires. On observe une diminution de la force 7 jours après l'injection de cardiotoxine, sans effet du traitement à l'haptoglobine comparativement à la patte controlatérale non lésé. Ce résultat confirme qu'après 7 jours, le muscle lésé n'est pas totalement reconstruit. De manière intéressante, 14 jours après la lésion, les souris traitées avec le véhicule ont une force similaire à un muscle non lésé, traduisant un retour des capacités fonctionnelles. Ce retour n'est pas observé chez les souris traitées à l'haptoglobine, témoignant d'une diminution des capacités intrinsèques du muscle squelettique après la lésion (**Figure 2G**). L'analyse de la force tétanique est encore en cours au moment de l'écriture de ce manuscrit.

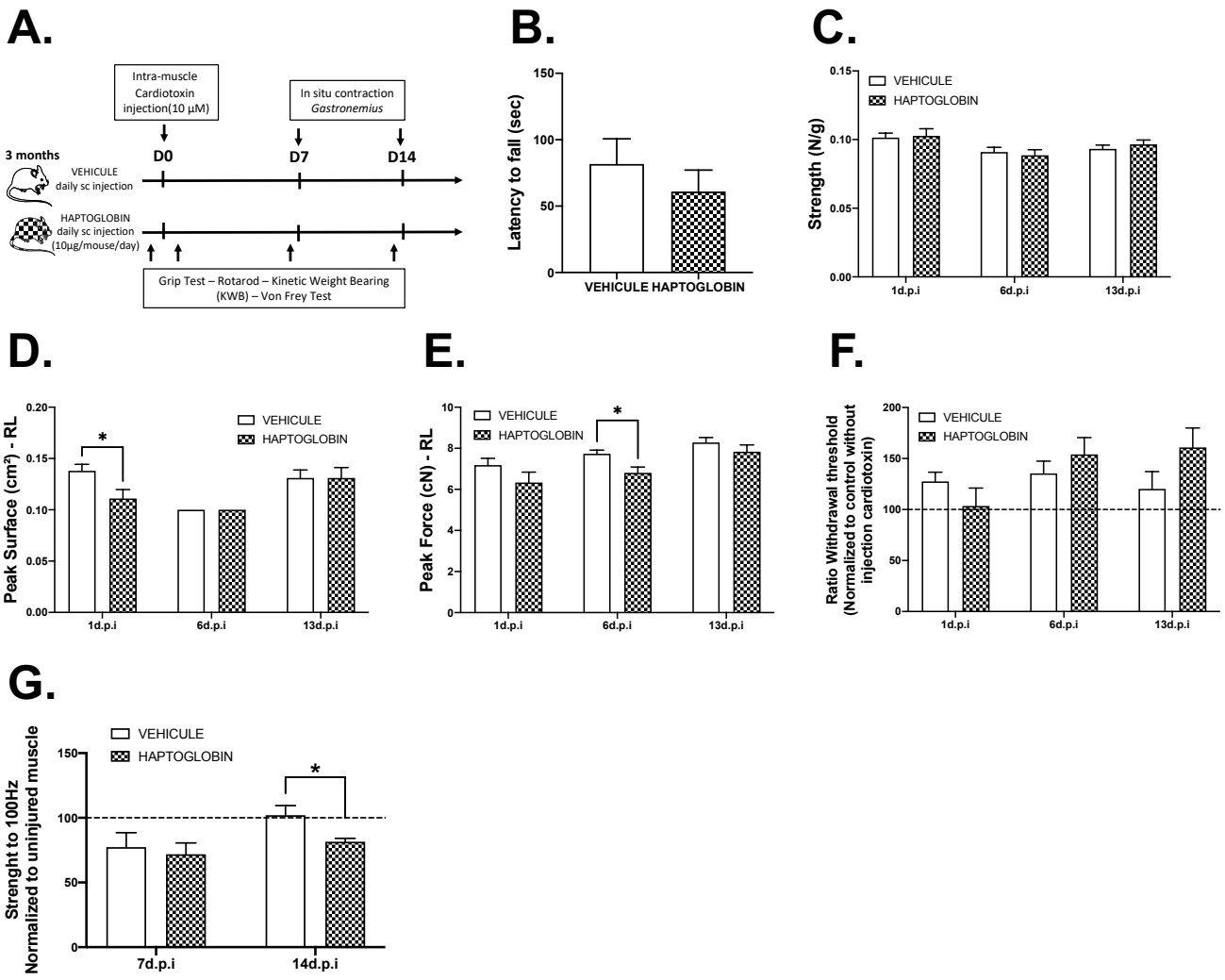


Figure 2 : L'haptoglobine altère la fonction musculaire, de manière spécifique, lors d'une régénération musculaire dans le *gastrocnemius* chez la souris âgée de 3 mois.
(A) Protocole de régénération musculaire induite par l'injection de cardiotoxine pendant un traitement de 14 jours à l'Hp. **B-G** Mesure de l'équilibre par le rotarod 13 jours après la lésion (n= 4 par groupe) **(B)** Mesure par grip test de la force musculaire générale 1, 6 et 13 jours après la lésion (n=9 à 10 par groupe) **(C)** Mesure par KWB de la surface d'appui dans la patte lésée (= RL) 1, 6 et 13 jours après la lésion **(D)** Mesure par KWB de la force dans la patte lésée (= RL) 1, 6 et 13 jours après la lésion (n= 10 par groupe) **(E)** Mesure par le test du Von Frey du seuil de retrait de la patte 1, 6 et 13 jours après la blessure (n= 10 par groupe) **(F)** Mesure par contraction in situ de la force intrinsèque à 100Hz, 14 jours après la blessure (n=6 à 7 par groupe) **(G).** Datas sont les moyennes means ± s.e.m. *P<0,05; Test de student.

Ces résultats, bien qu'incomplets, permettent de montrer que l'hyperhaptoglobinémie chronique provoquée semble affecter les capacités fonctionnelles intrinsèques d'un muscle, après une régénération musculaire.

Afin d'approfondir ces résultats, nous avons investigué le rôle de l'haptoglobine dans les différentes phases de la régénération musculaire. En effet, comme cité dans

la partie « introduction », la régénération musculaire est divisée en différentes phases dont la phase myogénique et la phase inflammatoire. Nous avons donc émis l'hypothèse que l'haptoglobine pouvait altérer une des deux phases voir ces deux phases.

2. Effets de l'haptoglobine sur la myogenèse lors d'une régénération musculaire chez la souris âgée de 3 mois

Afin de mieux comprendre comment l'haptoglobine pouvait cibler le muscle squelettique en régénération, nous avons tout d'abord souhaité connaitre l'évolution cinétique de l'expression des récepteurs et de l'haptoglobine au cours de la régénération musculaire dans le tissu musculaire lésé. Ainsi, l'expression de CCR2 est fortement induite dans les phases précoces de la régénération musculaire (2 jours après la lésion) puis diminue à partir de 7 jours, chez des souris contrôles (**Figure 3A**). Ce résultat indique que les cellules responsables de la forte expression de ce récepteur sont probablement les cellules inflammatoires puisqu'il est connu dans la littérature que ces cellules infiltrant le muscle expriment le récepteur CCR2, leur permettant ainsi de s'infiltrer au niveau de la zone lésée par chimiotactisme de l'axe CCR2-CCL2. Cependant, une publication récente démontre la présence transitoire de CCR2 sur les cellules satellites dans les premiers jours après une induction de la régénération musculaire[268]. En ce qui concerne l'expression génique du deuxième récepteur CD163, celle-ci augmente également dans les phases précoces puis diminue avant d'atteindre une expression similaire à un muscle non lésé chez les souris contrôles (**Figure 3B**). La variation de ce récepteur peut être également expliquée par la présence des cellules inflammatoires, positives pour ce récepteur. Enfin, concernant le gène de l'haptoglobine, celui-ci est exprimé de manière significative deux jours après la lésion induite par la cardiotoxine, temps qui correspond à la présence des cellules inflammatoires comme les neutrophiles, cellules capables de stocker dans des granules cette protéine[341] (**Figure 3C**). De façon intéressante, nous avons également étudié les effets du traitement à l'haptoglobine sur l'expression des récepteurs et de l'haptoglobine elle-même (**Figure 3A, 3B et 3C**, colonnes hachurées). On peut observer que l'haptoglobine induit une diminution du récepteur CCR2, 2 jours après la lésion et du récepteur CD163, 7 et 14 jours après la lésion. Ce résultat intéressant témoigne d'une action directe de l'haptoglobine sur ses

récepteurs et valide l'étude de mécanismes potentiels pour expliquer les effets de cette glycoprotéine.

Dans ce contexte, afin d'expliquer l'impact de l'haptoglobine sur la fonction musculaire, nous avons, dans un second temps, mesuré son impact au niveau des capacités de myogenèse *in vivo*. Pour cela, nous avons tout d'abord mesuré la distribution de l'aire des fibres, qui correspond à la répartition du pourcentage de fibres sur une coupe ayant une aire comprise entre deux valeurs déterminées. Cette distribution est altérée chez les souris traitées à l'haptoglobine. En effet, ces souris possèdent un pourcentage de fibres plus important présentant une plus petite aire comparativement aux souris contrôles (**Figure 3D**). Associé à ce résultat, la distribution des fibres positives pour un noyau central, marqueur de la régénération musculaire, varie dans le même sens (**Figure 3E**). A noter que la quantification du nombre de fibres centronuclées ne diffère pas en fonction du traitement (**Figure 3F**). Ces résultats suggèrent que l'haptoglobine pourrait agir sur des phases essentielles de la régénération affectant la morphologie du muscle squelettique. Il est néanmoins nécessaire de faire d'autres expériences comme par exemple de traiter les animaux plus tardivement dans la cinétique de régénération afin de confirmer ce rôle.

Au cours de leur activation, prolifération et différenciation, les cellules musculaires expriment différents marqueurs de la myogenèse dont il est possible d'étudier l'expression génique. Ainsi, nous avons pu observer que le traitement à l'haptoglobine retardait l'expression de certains gènes impliqués dans la myogenèse comme Pax7, marqueur de l'activation des cellules satellites (**Figure 3G**), 7 jours après l'induction de la lésion par la cardiotoxine. Ce décalage dans le temps est également observé pour les gènes de la différenciation comme Myf5 (**Figure 3I**) et la Myogénine (2 jours après la lésion **Figure 3K**). Enfin, l'expression de la myosine embryonaire/néonatale MyHC8 est également diminuée chez ces souris traitées (**Figure 3H**). A noter que l'expression de la MyHC3 n'est pas affectée par un traitement à l'haptoglobine (**Figure 3J**). Ces résultats confirment ceux obtenus avec l'étude histologique et indiquent que l'haptoglobine semble retarder la régénération musculaire 7 jours après l'induction de la blessure.

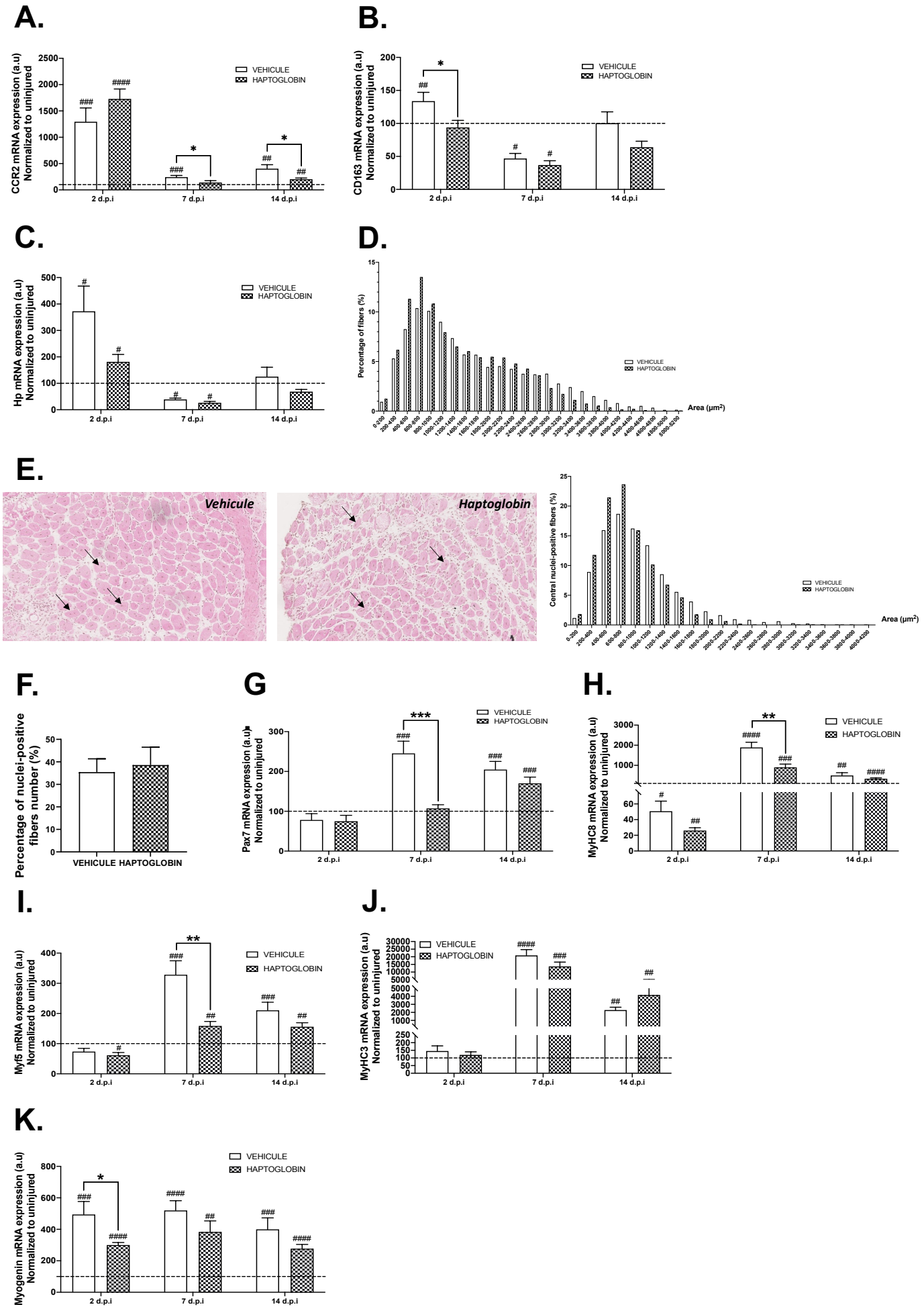

A.
CCR2 mRNA expression (a.u)
Normalized to uninjured
VEHICULE
HAPTOGLOBIN
2 d.p.i
7 d.p.i
14 d.p.i
B.
CD163 mRNA expression (a.u)
Normalized to uninjured
C.
Hp mRNA expression (a.u)
Normalized to uninjured
D.
Percentage of fibers (%)
Area (µm²)
E.
Vehicule
Haptoglobin
Central nuclei-positive fibers (%)
F.
Percentage of nuclei-positive fibers number (%)
VEHICULE HAPTOGLOBIN
G
Pax7 mRNA expression (a.u)
Normalized to uninjured
H.
MyHC8 mRNA expression (a.u)
Normalized to uninjured
I.
Myf5 mRNA expression (a.u)
Normalized to uninjured
J.
MyHC3 mRNA expression (a.u)
Normalized to uninjured
K.
Myogenin mRNA expression (a.u)
Normalized to uninjured

Figure 3 : L'haptoglobine altère la myogenèse lors d'une régénération musculaire dans le *gastrocnemius*, chez la souris âgée de 3 mois.
A-C Expression génique de CCR2 **(A)**, CD163 **(B)**, Hp (**C)** chez de souris âgées de 3 mois traitées avec le véhicule ou de l'Hp 2, 7 et 14 jours après l'injection de cardiotoxine (n=13 par groupe). **(D)** Distribution de l'aire des fibres totales chez des souris âgées de 3 mois traitées par le véhicule ou de l'Hp 7 jours après l'injection de cardiotoxine**. (E)** Sur le panel de gauche, image représentative d'une coupe de muscle coloré à l'hématoxyline et éosine de souris âgées de 3 mois traitées par le véhicule ou de l'Hp. Sur le panel de droite, distribution de l'aire des fibres positives pour un noyau central chez des souris âgées de 3 mois traitées par le véhicule ou de l'Hp 7 jours après l'injection de cardiotoxine. **(F)** Pourcentage du nombre de fibres centronucléées chez de souris âgées de 3 mois traitées avec le véhicule ou de l'Hp 7 jours après l'injection de cardiotoxine (n=7 par groupe). **G-K** Expression génique de Pax7 **(G)**, MyHC8 **(H)**, Myf5 **(I)**, MyHC3 **(J)** et Myogenine **(K)** chez de souris âgées de 3 mois traitées avec le véhicule ou de l'Hp 2, 7 et 14 jours après l'injection de cardiotoxine (n=13 par groupe). Datas sont les moyennes means ± s.e.m. *p<0,05 ; **p<0,01 ; ***p>0,001 par rapport au traitement véhicule et #p<0,05 ; ##p<0,01 ; ###p<0,001 par rapport à la patte non lésée. Test de student.

Ainsi cette étude a permis de mettre en évidence que l'hyperhaptoglobinémie induisait des altérations de la phase myogénique, diminuant les capacités fonctionnelles musculaires lors d'une régénération musculaire.

3. Effets de l'haptoglobine sur la myogenèse *in vitro*

Afin de mieux comprendre le rôle direct de l'haptoglobine dans les processus myogéniques au cours d'une régénération musculaire, nous avons utilisé deux modèles complémentaires de culture cellulaire : une culture de lignée cellulaire murine musculaire C2C12 et une culture primaire de cellules satellites, traitées avec un véhicule ou de l'haptoglobine.

a. Effet de l'haptoglobine sur la lignée cellulaire murin musculaire : C2C12

Dans un premier temps, nous disposons au sein du laboratoire d'une lignée cellulaire murine musculaire : les C2C12. Afin de déterminer le rôle direct de l'haptoglobine sur les cellules myogéniques, nous avons traité ces cellules à différents temps de culture. L'haptoglobine peut potentiellement agir sur différentes phases : i) la phase de prolifération, ii) les phases précoces et iii) tardive de la différenciation.

Tout d'abord, afin de mesurer les effets de l'haptoglobine sur la phase de prolifération des C2C12, nous avons effectué un traitement à l'haptoglobine à une concentration d'1μM lors de cette phase et nous avons utilisé le Cell Trace Violet. Ce colorant s'incorpore dans toutes les cellules et va progressivement se diluer au fil des

divisions cellulaires et sera observé grâce à la cytométrie en flux. Nous observons que les cellules traitées à l'haptoglobine ont le même profil de Cell Trace Violet que les cellules traitées avec un véhicule (**Figure 4A**) ce qui correspond à un profil de division similaire. De plus, afin de compléter ce résultat, nous avons mesuré la confluence de nos cellules. Celle-ci est similaire quelle que soit la condition de traitement (**Figure 4B**). Ces résultats suggèrent que l'haptoglobine n'impacte pas les phases de prolifération des cellules murine C2C12.

Afin d'étudier le rôle de l'haptoglobine sur la différenciation des cellules musculaires, nous les avons traitées à l'haptoglobine soit les deux premiers jours de la différenciation soit pendant toute la phase de différenciation et mesuré différents paramètres comme l'expression des gènes impliqués dans la myogenèse et des marqueurs de morphologie tels que l'index de fusion et la largeur des myotubes. Nos résultats suggèrent que l'haptoglobine induit une diminution de l'expression de certains gènes de la myogenèse comme MyHC8, MyoD et la Myogenine dans les premières phases de la différenciation musculaire (**Figure 4C**). De plus, nous avons regardé une des voies impliquées dans la différenciation musculaire : la voie p38-MAPK. Comme illustré en **Figure 4D-4E**, un traitement à l'haptoglobine dans les premières phases de la différenciation cellulaire induit une diminution de la phosphorylation de la voie p38-MAPK, signe d'une sous-activation de cette voie. Associé à ce résultat, les cellules traitées à l'haptoglobine ont un index de fusion, évalué en mesurant le nombre de noyaux par myotubes divisé par le nombre de noyaux totaux, diminué sans altération de la largeur des fibres, après un traitement pendant toute la différenciation (**Figure 4F-4H**). Il semblerait donc que l'haptoglobine induise une diminution des capacités de différenciation des cellules musculaires C2C12, sans altérer les processus de prolifération.

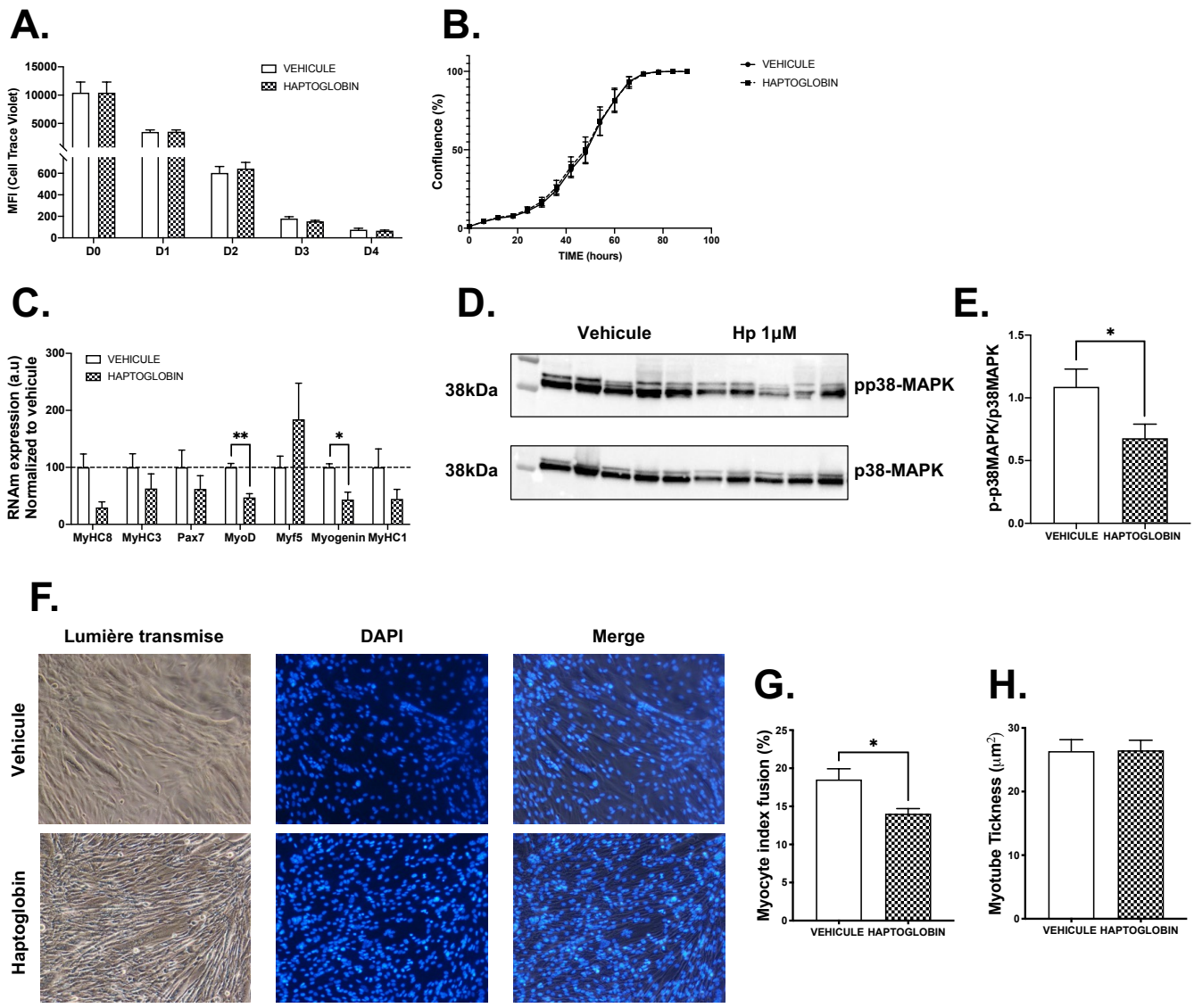


Figure 4 : L'haptoglobine altère la myogenèse chez des cellules musculaires C2C12. **(A)** Moyenne de l'intensité de fluorescence (= MFI) du colorant Cell Trace Violet chez des cellules C2C12, traitées par le véhicule ou de l'Hp pendant 4 jours. **(B)** Confluence des cellules C2C12 mesurée par l'incucyte après un traitement par le véhicule ou de l'Hp. **(C)** Expression des gènes de la myogenèse des cellules C2C12 traitées par le véhicule ou de l'Hp pendant les 2 premiers jours de la différenciation. **(D)** Western Blot de la protéine pp38-MAPK chez des cellules C2C12 traitées par le véhicule ou de l'Hp (n= 5 par groupe). **(E)** Quantification du Western Blot de la protéine pp38-MAPK par analyse densitométrique chez des cellules C2C12 traitées par le véhicule ou de l'Hp (n= 5 par groupe). **(F)** Images représentant les C2C12 traitées par le véhicule ou l'Hp en lumière transmise (panel de gauche), marqué au DAPI (panel du milieu) et le merge (panel de droite). **G-H** Mesure de l'index de fusion **(G)** et de la largeur des myotubes **(H)** sur des cellules C2C12 traitées par le véhicule ou de l'Hp pendant les 6 jours de la différenciation (n=5 par groupe). Datas sont les moyennes means ± s.e.m. *p<0,05 ; **p<0,01. Test de student.

b. Effet de l'haptoglobine sur les cellules satellites isolées

Après plusieurs étapes de mise au point, nous sommes parvenus à trier les cellules satellites d'un *gastrocnemius* grâce au tri cellulaire avec cette stratégie : $CD45^-$ et $Cd11b^-$ afin d'exclure les cellules inflammatoires, $CD31^-$ afin d'exclure les cellules endothéliales et Sca_1^- afin d'éviter d'avoir une contamination avec des progéniteurs fibro-adipogéniques. Enfin, afin de marquer les cellules satellites, nous nous sommes servis d'un de ses marqueurs de surface : α_7-intégrine (**Figure 5A**).

Lors de la culture primaire, les cellules satellites vont proliférer, puis sortir du cycle cellulaire afin de rentrer dans un processus de myogenèse (« *commitment* »). Les cellules vont ensuite se différencier et fusionner afin de former des myotubes. Nous avons étudié le rôle de l'haptoglobine sur ces différentes phases : la phase de prolifération, la phase de différenciation précoce et la phase de différenciation tardive (**Figure 5B**). Dans un premier temps, nous avons traité nos cellules satellites avec différentes doses d'haptoglobine : 5μM, 1μM et 0,1μM, pendant la prolifération et mesuré le nombre de clusters formés par les cellules satellites, qui renseigne sur les capacités de clonogénicité des cellules, témoignant de leurs caractéristiques prolifératives. De manière intéressante, nous observons qu'une dose élevée d'haptoglobine (5μM) induit une augmentation du nombre de clusters dès 2 jours et jusqu'à 6 jours de culture (**Figure 5C**). Associé à ce résultat, la confluence est également augmentée à partir du 4^{ième} jours de culture chez des cellules satellites traitées à l'haptoglobine 5μM (**Figure 5D**). Les deux autres doses semblent également augmenter le nombre de clusters au début du processus de prolifération et semblent diminuer la confluence (**Figure 5C-D**). Afin d'expliquer l'augmentation du nombre de clusters et de la confluence après un traitement à l'haptoglobine, nous avons émis l'hypothèse d'une action délétère sur la transition entre la phase de prolifération et la phase de différenciation, appelé « *commitment* » ou engagement. Afin de mesurer ce *commitment*, nous envisageons de réaliser un marquage $MyoD^+$ et $Myogenin^+$, deux marqueurs de la myogenèse et de la différenciation. Cette étude est en cours d'analyse.

Pour finir, nous allons mesurer l'effet potentiel de l'haptoglobine sur la différenciation précoce (les premiers jours du processus) et tardive (pendant toute la durée de la phase de différenciation). D'après la **Figure 5E**, il semblerait que

l'haptoglobine puisse induire une diminution de l'index de fusion des myotubes. Cependant, nous avons conscience du faible pourcentage que nous avons obtenu. De ce fait, actuellement, des expériences supplémentaires sont en cours afin d'augmenter ce pourcentage et de valider le rôle de l'haptoglobine lors de la différenciation des cellules satellites. Enfin, afin de comprendre le rôle de l'haptoglobine sur ces phases de différenciation, nous réalisons actuellement une étude de l'expression des gènes impliqués dans le processus myogénique.

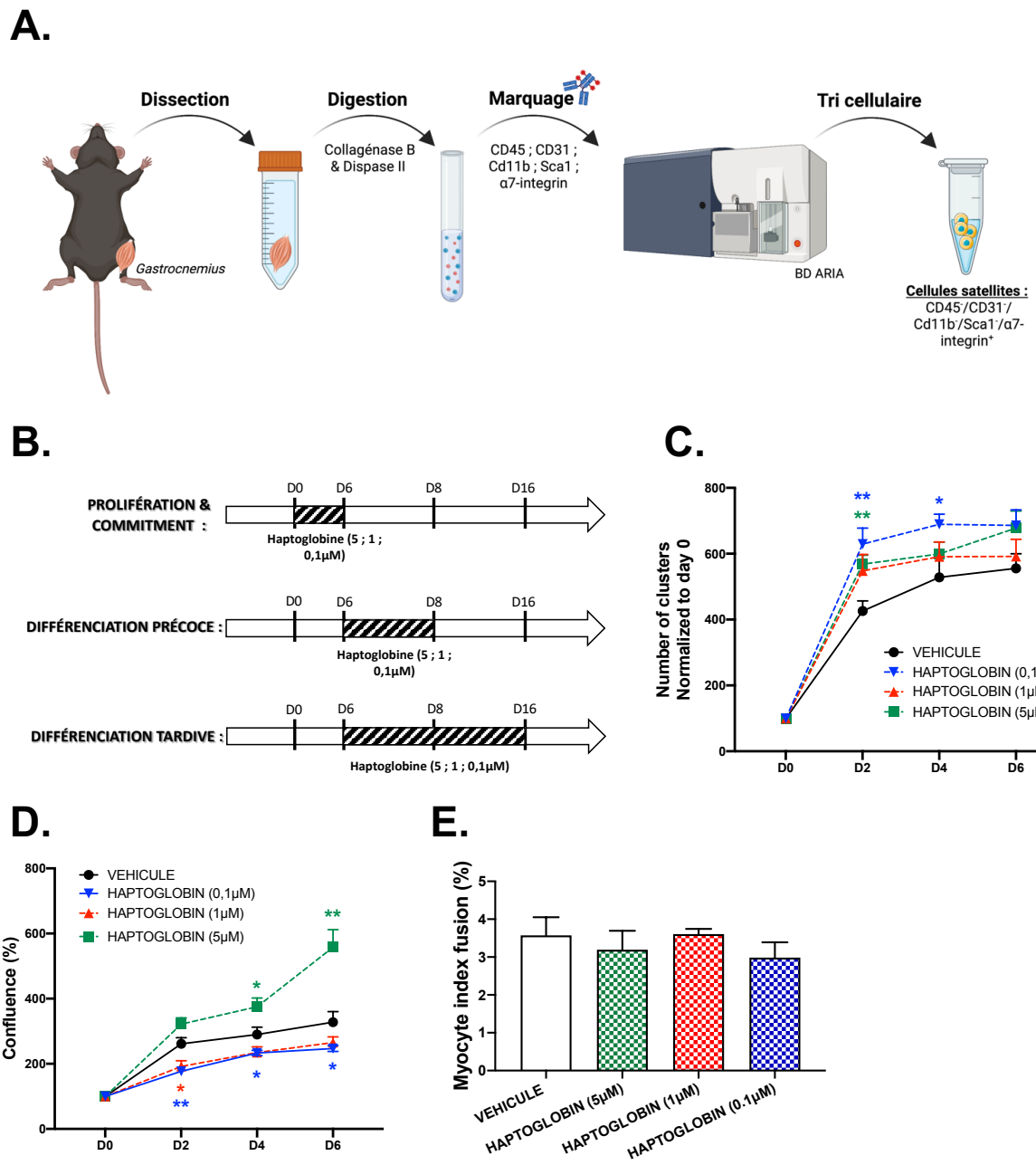


Figure 5 : Rôle de l'haptoglobine sur une culture primaire de cellules satellites.
(A) Schéma du protocole expérimental d'isolation de cellules satellites à partir d'un *gastrocnemius* de souris âgées de 7 semaines. **(B)** Schéma du protocole expérimental des traitements par l'Hp. **(C)** Cinétique du nombre de clusters formés par les cellules satellites traitées par un véhicule ou de l'Hp à 5μM, 1μM et 0,1μM (n=5 par groupe). **(D)** Cinétique de la confluence des cellules satellites traitées par un véhicule ou de l'Hp à 5μM, 1μM et 0,1μM (n=5 par groupe). **(E)** Mesure de l'index de fusion sur des cellules satellites traitées par un véhicule ou de l'Hp à 5μM, 1μM et 0,1μM, pendant les 10 jours de la différenciation (n=3 par groupe). Datas sont les moyennes means ± s.e.m. *p<0,05 ; **p<0,01 Test de student.

Ces résultats bien, qu'incomplets, permettent néanmoins de montrer qu'un traitement à l'haptoglobine induit une augmentation des capacités de prolifération des cellules satellites, associée à une diminution de la différenciation musculaire.

4. Effets de l'haptoglobine sur les cellules inflammatoires chez la souris âgée lors d'une régénération musculaire chez la souris âgée de 3 mois

Comme cité en introduction, les deux récepteurs à l'haptoglobine (CCR2 et CD163) sont présents sur les cellules inflammatoires, cellules clés dans l'initiation du processus de régénération musculaire. Nous avons pu montrer qu'au cours d'une régénération musculaire induite par la cardiotoxine, nous retrouvions l'expression des deux récepteurs sur les cellules inflammatoires ($CD45^+/CCR2^+$ et $CD45^+/CD163^+$) (**Figure 6A**). Dans ce contexte, il nous semblait donc important d'investiguer le potentiel rôle de l'haptoglobine sur la phase inflammatoire lors d'une régénération musculaire. Ainsi, nous avons étudié la proportion des différentes populations cellulaires de la phase inflammatoire (les neutrophiles et les deux types de macrophages M1 et M2) *via* la technique de cytométrie en flux. La population de cellules $CD45^+$ au sein d'une souris traitée avec le véhicule augmente fortement après deux jours de lésion et diminue petit à petit, 7 et 14 jours après la lésion. Les souris traitées avec l'haptoglobine ont un profil de cellules $CD45^+$ identique (**Figure 6B**). A 2, 7 ou encore 14 jours, les différentes populations de cellules inflammatoires telles que les neutrophiles et les macrophages sont représentées dans les mêmes proportions quel que soit le traitement, bien que la proportion de macrophages de type M1 augmente à 2 jours après la lésion et que le pourcentage de macrophages total augmente à 14 jours après la lésion (**Figure 6C-E**).

Dans un deuxième temps, afin de confirmer les résultats sur le pourcentage des différentes populations de cellules inflammatoires, nous avons regardé l'expression de gènes caractéristiques des différentes cellules inflammatoires ainsi que des cytokines pro et anti-inflammatoires. On observe, chez des souris traitées par le véhicule (= PBS), une forte induction de l'expression de CD45 et de F4/80 induite dans les premières phases de la régénération musculaire. Cette expression diminue progressivement dans le temps (7 et 14 jours après la lésion). L'expression de ces gènes lors de la régénération musculaire concorde avec les données de la littérature. De manière très surprenante, les souris traitées à l'haptoglobine présentent une diminution de l'expression de CD45 au cours des trois cinétiques étudiées (2, 7 et 14 jours - **Figure 6F**) et du marqueur des macrophages F4/80 14 jours après la lésion musculaire (**Figure 6G**). Enfin, nous avons étudié l'expression génique des cytokines pro et anti-inflammatoires. L'expression des cytokines pro-inflammatoires suit bien les données de la littérature puisqu'on observe une augmentation de leur expression dès le deuxième jour après l'injection de cardiotoxine chez des souris traitées avec le véhicule. Cette expression revient à une valeur basale dès 7 jours. Bien que deux des trois cytokines pro-inflammatoires étudiées ne soient pas impactées par le traitement à l'haptoglobine (**Figure 6H et 6I**), l'expression génique de l'IL1-β est fortement diminuée 7 jours après la blessure ainsi qu'à 14 jours (**Figure 6J**). Pour finir, en ce qui concerne, l'IL-10, cytokine anti-inflammatoire impliquée lors de la transition des macrophages de type M1 en macrophages de type M2, son expression est également fortement induite dans les phases précoces et diminue par la suite. Un traitement à l'haptoglobine semble diminuer son expression à 2 jours après la lésion (**Figure 6K**).

Bien que la proportion des cellules inflammatoires ne change pas en présence d'haptoglobine, il semblerait qu'elle agisse toute de même sur ces cellules, probablement sur leurs sécrétions ou leurs fonctions.

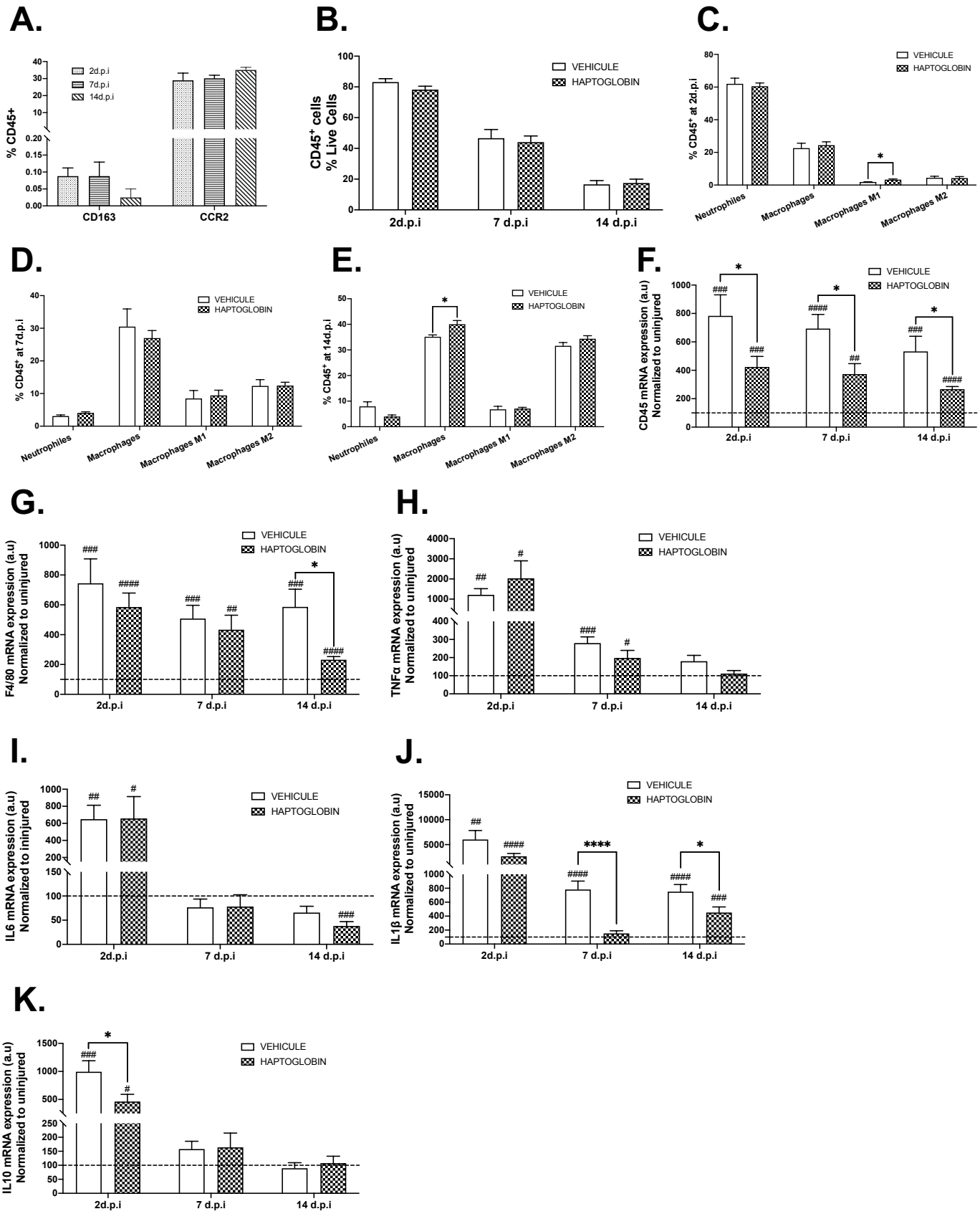

A.
% CD45+
2d.p.i
7d.p.i
14d.p.i
CD163
CCR2
B.
CD45+ cells
% Live Cells
VEHICULE
HAPTOGLOBIN
2d.p.i
7 d.p.i
14 d.p.i
C.
% CD45+ at 2d.p.i
VEHICULE
HAPTOGLOBIN
Neutrophiles
Macrophages
Macrophages M1
Macrophages M2
D.
% CD45+ at 7d.p.i
VEHICULE
HAPTOGLOBIN
Neutrophiles
Macrophages
Macrophages M1
Macrophages M2
E.
% CD45+ at 14d.p.i
VEHICULE
HAPTOGLOBIN
Neutrophiles
Macrophages
Macrophages M1
Macrophages M2
F.
CD45 mRNA expression (a.u)
Normalized to uninjured
VEHICULE
HAPTOGLOBIN
2d.p.i
7 d.p.i
14 d.p.i
G.
F4/80 mRNA expression (a.u)
Normalized to uninjured
VEHICULE
HAPTOGLOBIN
2d.p.i
7 d.p.i
14 d.p.i
H.
TNFα mRNA expression (a.u)
Normalized to uninjured
VEHICULE
HAPTOGLOBIN
2d.p.i
7 d.p.i
14 d.p.i
I.
IL6 mRNA expression (a.u)
Normalized to ininjured
VEHICULE
HAPTOGLOBIN
2d.p.i
7 d.p.i
14 d.p.i
J.
IL1β mRNA expression (a.u)
Normalized to uninjured
VEHICULE
HAPTOGLOBIN
2d.p.i
7 d.p.i
14 d.p.i
K.
IL10 mRNA expression (a.u)
Normalized to uninjured
VEHICULE
HAPTOGLOBIN
2d.p.i
7 d.p.i
14 d.p.i

Figure 6 : L'haptoglobine induit une modification de l'expression des gènes de l'inflammation, sans altérer la proportion des cellules inflammatoires lors d'une régénération musculaire dans le *gastrocnemius*, chez la souris âgée de 3 mois.
(A) Pourcentage de cellules $CD45^+$ exprimant le CD163 ou le CCR2 (n=5 par groupe). **(B)** Pourcentage de $CD45^+$dans le muscle *gastrocnemius* de souris âgées de 3 mois traitées par un véhicule ou de l'Hp (n=5 par groupe). **C-E** Pourcentage de neutrophiles, de macrophages, de macrophages M1, de macrophages M2 dans le muscle *gastrocnemius* de souris âgées de 3 mois traitées par un véhicule ou de l'Hp à 2 **(C)**, 7 **(D)** et 14 **(E)** jours après la lésion (n=5 par groupe). **F-K** Expression génique de CD45 **(F)**, F4/80 **(G)**, TNFα (**H)**, IL6 **(I)**, IL1β **(J)** et IL10 **(K)** chez de souris âgées de 3 mois traitées par le véhicule ou de l'Hp 2, 7 et 14 jours après l'injection de cardiotoxine (n=13 par groupe). Datas sont les moyennes means ± s.e.m. *p<0,05; ****p<0,0001 et #p<0,05 ; ##p<0,01 ; ###p<0,001 par rapport à la patte non lésée. Test de student.

5. Effets de l'haptoglobine sur la myogenèse et l'inflammation lors d'une régénération musculaire chez la souris âgée de 12 mois

Comme évoqué dans l'introduction, les capacités de régénération musculaire sont altérées au cours du vieillissement. De ce fait, afin de savoir si l'haptoglobine participe à ces altérations, nous avons traité des souris âgées de 12 mois de manière à obtenir une haptoglobinémie similaire à une souris âgée de 24 mois. Après application du même protocole que réalisé sur les souris âgées de 3 mois (cf **Figure 2A**), nous avons ensuite réalisé les mêmes études au niveau fonctionnel et myogénique lors d'une régénération musculaire (**Figure 7A**).

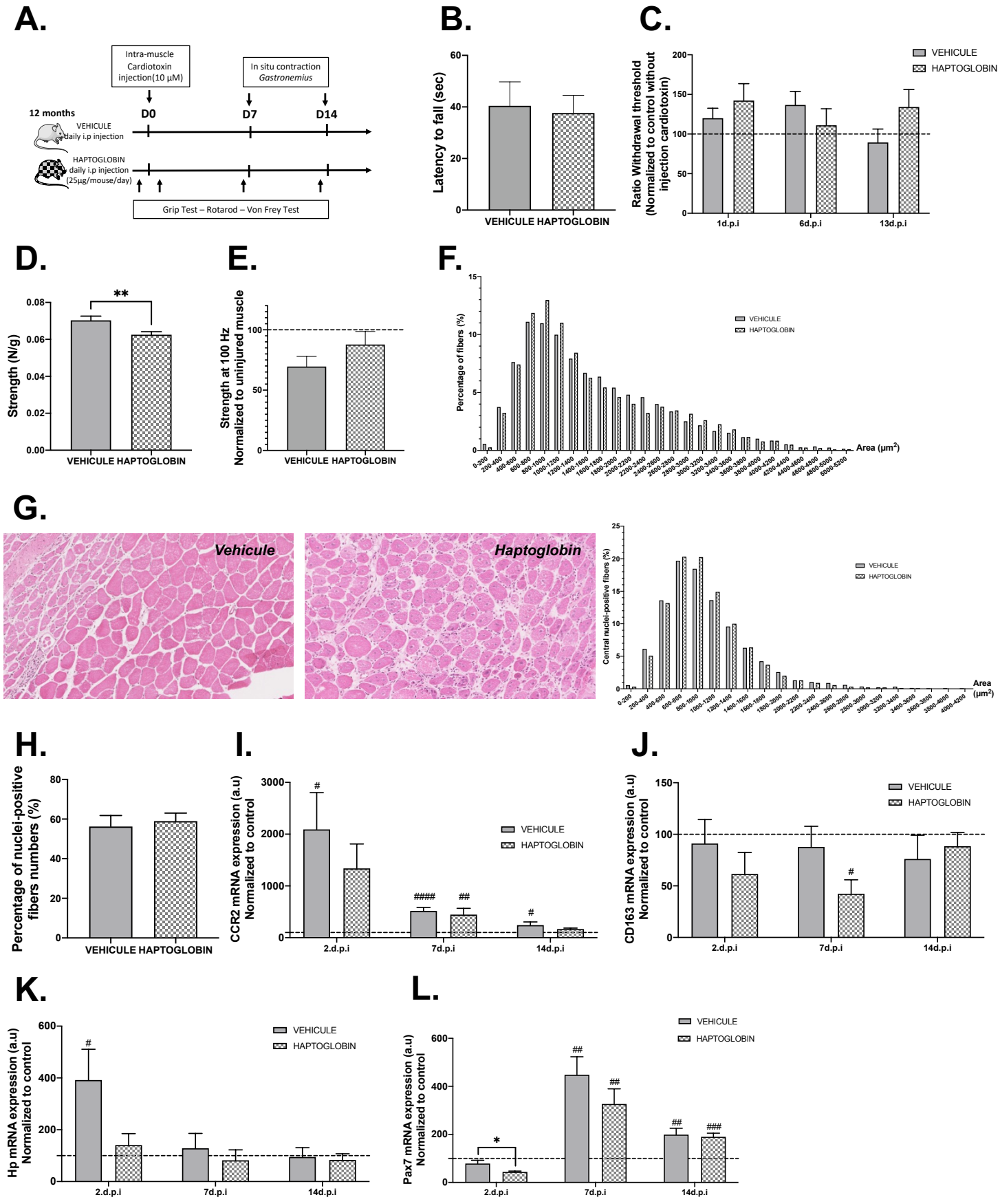
En ce qui concerne la fonction musculaire, grâce au rotarod, nous pouvons observer que les souris traitées à l'haptoglobine ont une capacité d'équilibre identique (**Figure 7B**) et sont sensibles de la même manière à la douleur (**Figure 7C**) que les souris traitées par le véhicule. Cependant, contrairement aux souris âgées de 3 mois traitées à l'haptoglobine, la force musculaire mesurée par le test d'agrippement est diminuée chez des souris âgées de 12 mois traitées à l'haptoglobine par rapport à des souris traitées par le véhicule 13 jours après injection de la cardiotoxine (**Figure 7D)**. Enfin, la force intrinsèque du muscle a été mesurée à 14 jours. Contrairement aux souris âgées de 3 mois, cette force à 7 jours après la lésion chez des souris traitées par le véhicule n'est pas revenue à des valeurs basales, traduisant d'une absence d'un retour des capacités fonctionnelles. De manière étonnante, on observe aucune différence entre les souris traitées par le véhicule ou l'haptoglobine (**Figure 7E**).

Afin d'expliquer ces résultats, nous avons également étudié l'impact d'un traitement à l'haptoglobine sur les processus myogéniques *in vivo*, grâce à une étude

histomorphologique et une étude génique. Bien que l'effet soit moins marqué que chez les souris âgées de 3 mois, il semblerait que l'haptoglobine induise également un retard ou un défaut dans les processus de régénération musculaire chez les souris âgées de 12 mois (**Figure 7F**). En effet, on observe une proportion de fibres musculaires plus importante présentant une plus petite aire dans le *gastrocnemius* des souris traitées à l'haptoglobine par rapport aux souris non traitées (**Figure 7F**). Ce résultat est confirmé par l'étude de la proportion des aires positives aux noyaux centraux (**Figure 7G**). Enfin, de manière similaire aux souris âgées de 3 mois, la quantification du nombre de fibres centronuclées ne diffère pas en fonction du traitement (**Figure 7H**).

L'évolution des récepteurs et de l'haptoglobine au cours de la régénération musculaire suit la même cinétique que chez les souris âgées de 3 mois puisque nous pouvons observer une augmentation de ces trois acteurs 2 jours après la lésion puis un retour à une expression basale. Il semblerait que le système haptoglobine-récepteur ne soit pas impacté par un traitement à l'haptoglobine, contrairement à l'effet sur les souris âgées de 3 mois (**Figure 7I-J**). Ce résultat peut s'expliquer par une perte de régulation avec l'âge mais également par une augmentation insuffisante de l'haptoglobinémie.

Enfin, après étude des gènes impliqués dans la myogenèse, il semblerait que l'haptoglobine induise une altération des processus myogéniques de régénération musculaire, qui est cependant plus nuancée que chez la souris âgée de 3 mois. Dans un premier temps, en **Figure 7L-P**, on peut observer que l'expression des gènes impliqués dans la myogenèse augmente après une lésion musculaire, validant le protocole d'injection de cardiotoxine chez les souris âgées de 12 mois. De plus, un traitement à l'haptoglobine semble induire une diminution significative de l'expression génique de Pax7 2 jours après la lésion (**Figure 7L**) et de Myf5 7 jours après (**Figure 7N**). Pour certains gènes, la variabilité au sein des groupes reste très élevée. Une augmentation du nombre d'individu permettrait de mieux trancher sur l'effet de l'haptoglobine sur l'expression de ces gènes.


A.
Intra-muscle Cardiotoxin injection(10 µM)
In situ contraction Gastronemius
12 months
D0
D7
D14
VEHICULE daily i.p injection
HAPTOGLOBIN daily i.p injection (25µg/mouse/day)
Grip Test – Rotarod – Von Frey Test
B.
Latency to fall (sec)
VEHICULE HAPTOGLOBIN
C.
Ratio Withdrawal threshold (Normalized to control without injection cardiotoxin)
VEHICULE
HAPTOGLOBIN
1d.p.i
6d.p.i
13d.p.i
D.
Strength (N/g)
**
VEHICULE HAPTOGLOBIN
E.
Strength at 100 Hz Normalized to uninjured muscle
VEHICULE HAPTOGLOBIN
F.
Percentage of fibers (%)
VEHICULE
HAPTOGLOBIN
Area (µm²)
G.
Vehicule
Haptoglobin
Central nuclei-positive fibers (%)
VEHICULE
HAPTOGLOBIN
Area (µm²)
H.
Percentage of nuclei-positive fibers numbers (%)
VEHICULE HAPTOGLOBIN
I.
CCR2 mRNA expression (a.u) Normalized to control
VEHICULE
HAPTOGLOBIN
2.d.p.i
7d.p.i
14d.p.i
J.
CD163 mRNA expression (a.u) Normalized to control
VEHICULE
HAPTOGLOBIN
2.d.p.i
7d.p.i
14d.p.i
K.
Hp mRNA expression (a.u) Normalized to control
VEHICULE
HAPTOGLOBIN
2.d.p.i
7d.p.i
14d.p.i
L.
Pax7 mRNA expression (a.u) Normalized to control
VEHICULE
HAPTOGLOBIN
2.d.p.i
7d.p.i
14d.p.i

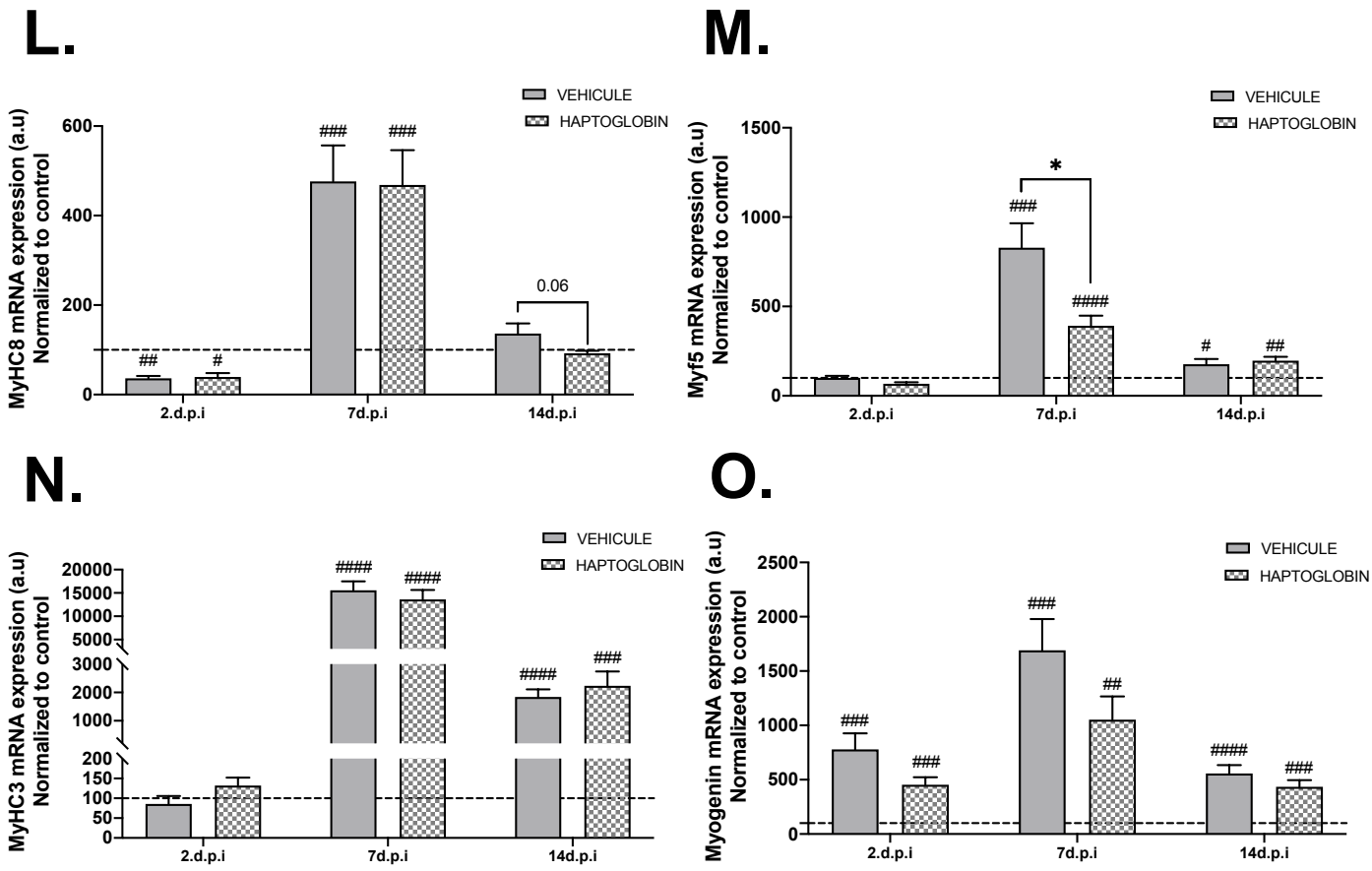


Figure 7 : L'haptoglobine semble altérer la myogenèse lors d'une régénération musculaire chez la souris âgée de 12 mois.

(A) Protocole de régénération musculaire induite par l'injection de cardiotoxine pendant un traitement de 14 jours à l'haptoglobine. **B-E** Mesure de l'équilibre par le rotarod 13 jours après la lésion (n=10 par groupe) **(B)** Mesure par le test du Von Frey du seuil de retrait de la patte 1, 6 et 13 jours après la lésion (n=10 par groupe) **(C)** Mesure par grip test de la force musculaire générale 1, 6 et 13 jours après la lésion (n=16 par groupe) **(D)** Mesure par contraction in situ de la force intrinsèque à 100Hz 13 jours après la lésion (n= 7 à 8 par groupe) **(E). (F)** Distribution de l'aire des fibres totales chez des souris âgées de 12 mois traitées par le véhicule ou de l'Hp 7 jours après l'injection de cardiotoxine. **(G)** Sur le panel de gauche, image représentative d'une coupe de muscle coloré à l'hématoxyline et éosine de souris âgées de 12 mois traitées par le véhicule ou de l'Hp. Sur le panel de droite, distribution de l'aire des fibres positives pour un noyau central chez des souris âgées de 12 mois traitées par le véhicule ou de l'Hp 7 jours après la lésion. **(H)** Pourcentage du nombre de fibres centronucléées chez de souris âgées de 12 mois traitées avec le véhicule ou de l'Hp 7 jours après l'injection de cardiotoxine (n=7 par groupe). **I-O** Expression génique de CCR2 **(I)**, CD163 **(J)**, Hp (**K)**, Pax7 **(L)**, MyHC8 **(M)**, Myf5 **(N)**, MyHC3 **(O)** et Myogenine **(P)** chez de souris âgées de 12 mois traitées par le véhicule ou de l'Hp 2, 7 et 14 jours après la lésion (n= 8 par groupe). Datas sont les moyennes means ± s.e.m. *p<0,05 ; **p<0,01 et #p<0,05 ; ##p<0,01 ; ###p<0,001 ; ####p<0,0001 par rapport à la patte non lésée. Test de student.

De la même manière que le protocole réalisé sur des souris âgées de 3 mois, nous avons étudié les gènes impliqués dans les processus inflammatoires. Nous observons que les souris traitées avec le véhicule ont une forte expression génique de CD45 et

F4/80, témoignant de la présence des cellules inflammatoires après une lésion musculaire (**Figure 8A** et **8B**). De manière intéressante, les souris traitées à l'haptoglobine ont une diminution de l'expression de CD45 7 jours après la lésion et une expression génique de F4/80 augmentée 2 jours après la lésion (**Figure 8A** et **8B**). Enfin, nous avons étudié les gènes des cytokines pro-inflammatoires (Le TNF-α, l'IL6 et l'IL1-β). L'expression génique de celles-ci se retrouve augmentée dans les premiers jours qui suit une lésion musculaire et est diminuée dans le temps. Ces résultats sont concordants avec les données de la littérature. Un traitement à l'haptoglobine semble diminuer l'expression génique de ces cytokines à 2 et 7 jours après la lésion. De manière inattendue, l'haptoglobine semble augmenter leur expression génique à 14 jours après la lésion (**Figure 8C-E**). Ces données suggèrent que l'haptoglobine affecte la composante inflammatoire lors d'une régénération musculaire chez la souris âgée de 12 mois. Des expériences complémentaires sont à réaliser afin de comprendre plus en détails l'impact de cette protéine sur l'inflammation.

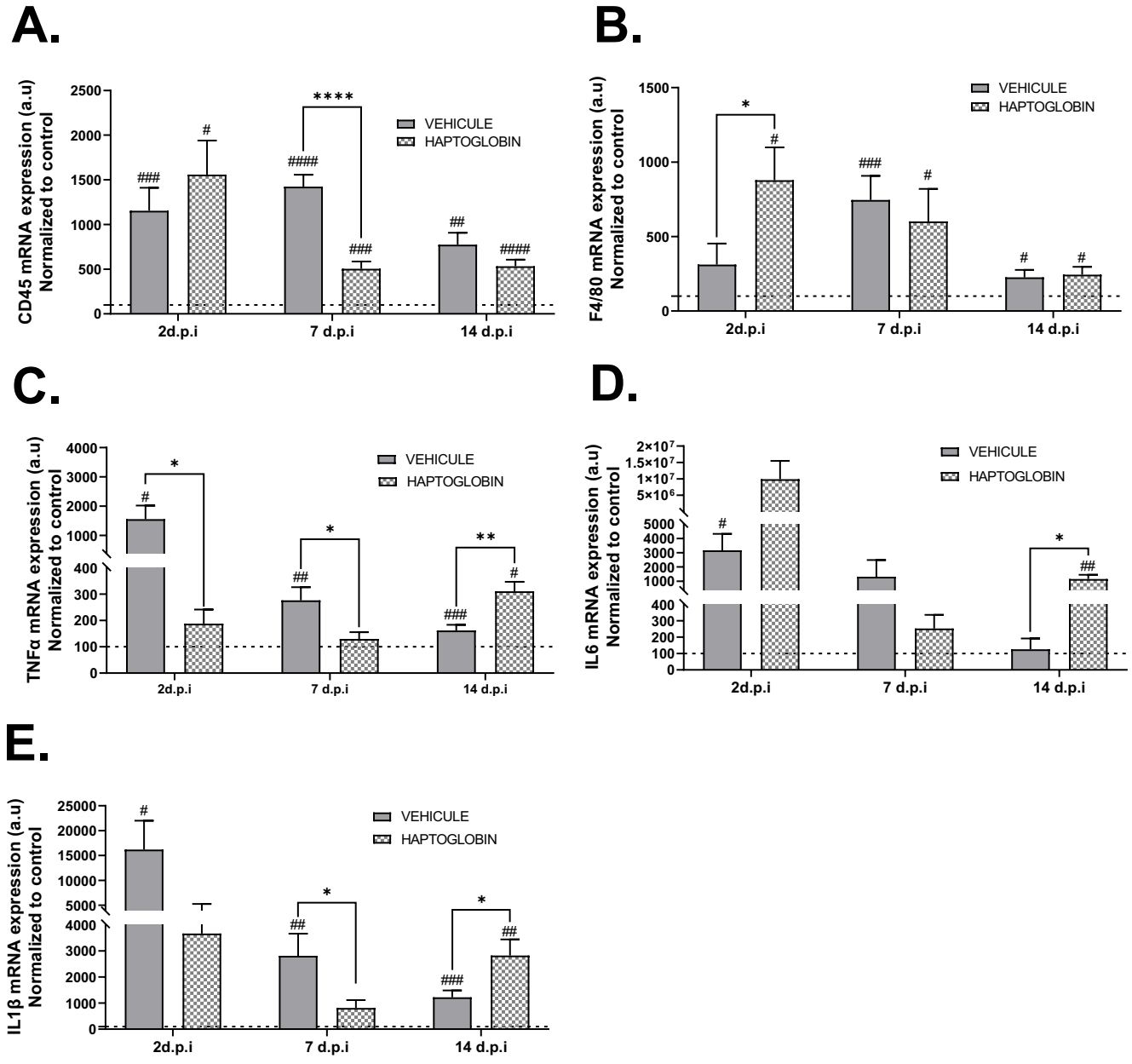


Figure 8 : L'haptoglobine semble induire une modification de l'expression des gènes de l'inflammation.

A-E Expression génique de CD45 **(A)**, F4/80 **(B)**, TNFα (**C**), IL6 **(D)**, et IL1β **(E)** chez de souris âgées de 12 mois traitées par le véhicule ou de l'Hp 2, 7 et 14 jours après l'injection de cardiotoxine (n=8 par groupe). Datas sont les moyennes means ± s.e.m. *p<0,05 ; **p<0,01 ; ****p<0,0001 et #p<0,05 ; ##p<0,01 ; ###p<0,001 ; ####p<0,0001 par rapport à la patte non lésée. Test de student.

Tous ces résultats semblent indiquer que l'haptoglobine, chez la souris âgée de 3 et de 12 mois, retarde les processus de régénération musculaire ce qui conduit à des altérations morphologiques et fonctionnelles. Plus précisément, cette protéine semble altérer les phases de prolifération et de différenciation des cellules myogéniques. De plus, bien que les résultats soient préliminaires et à compléter, il semblerait que l'haptoglobine puisse potentiellement agir sur les sécrétions des cellules immunitaires. De cette manière, il semblerait que l'haptoglobine participe aux altérations des processus de régénération observées au cours du vieillissement.

●●●

DISCUSSION

●●●

- **L'haptoglobine : une protéine délétère pour la régénération musculaire :**

Dans un premier temps, ces travaux de thèse ont permis de mettre en évidence que l'haptoglobine ne semblait pas affecter la fibre mature et la physiologie musculaire associée. En effet, bien que la force mesurée par le grip test chez des souris âgées de 3 mois traitées à l'haptoglobine soit équivalente à une souris âgée de 12 mois WT, les données morphologiques et géniques ne valident pas cette observation. Il serait tout de même intéressant de valider grâce à d'autres expériences ces premières observations (KWB, contraction *in situ*, rotarod).

Dans un second temps, ces travaux de thèse nous ont permis de mettre en évidence partiellement le rôle de l'haptoglobine dans les processus de régénération. Comme nous avons pu le voir avec les différentes figures présentées dans la partie résultat, l'haptoglobine induit, *in vivo*, un retard de l'expression des gènes de la myogenèse, une diminution de la taille des fibres et une fonction musculaire altérée après une induction de la régénération musculaire par une injection intramusculaire de cardiotoxine. *In vitro*, l'haptoglobine induit une diminution des capacités de différenciation musculaire. Tous ces résultats permettent de souligner l'implication de cette glycoprotéine dans la perte des capacités régénératives associée au vieillissement. La comparaison entre des souris âgées de 3 mois traitées à l'haptoglobine et des souris âgées de 12 mois WT soutiennent ces observations. En effet, comme nous avons pu le voir dans la Figure 2G, les souris âgées de 3 mois traitées à l'haptoglobine présentent une diminution de la force intrinsèque d'environ 18,5% 14 jours après la lésion musculaire. Pour rappel, à ce temps-là, le muscle lésé d'une souris traitée avec du PBS a retrouvé une capacité de contraction intrinsèque comparable à un muscle non lésé. Or, les souris âgées de 12 mois ont, quant à elle, une perte de 30,56%. Cette observation permet de renforcer l'idée que l'hyperhaptoglobinémie chez des souris âgées de 3 mois tendent vers un phénotype comparable à celui d'une souris âgées 12 mois, reproduisant, en partie, les altérations observées au cours du vieillissement.

Cependant, il reste à investiguer les potentielles voies de signalisation impliquées ainsi que le/les récepteur(s) mis en jeu. Certains travaux de la bibliographie lient l'un des récepteurs à l'haptoglobine, CCR2, et les voies de signalisation de la famille MAPK et nous laissent penser que l'une de ces voies de signalisation pourrait être impliquée.

En effet, le premier point qui nous permet d'émettre cette hypothèse est l'activation *via* le récepteur CCR2 de la voie ERK1/2, membre de la famille des MAPK, sur les monocytes, induisant une chimio-attraction de ces cellules[336]. De plus, un résultat préliminaire sur la lignée cellulaire C2C12 (**Figure 4D**) suggère un rôle sur la voie p38-MAPK, autre membre de cette famille. Cette voie p38-MAPK, comme décrit dans la littérature et évoqué en introduction de ce manuscrit de thèse, joue un rôle dans les processus myogéniques en activant la différenciation des cellules musculaires[190,194]. Cette voie est impliquée également dans le renouvellement des cellules satellites pendant la division asymétrique[191,264]. De même, une étude menée en 2021 par Blanc et ses collaborateurs démontre que l'activation de la voie p38-MAPK permet d'inhiber la différenciation musculaire dans les premières phases de la régénération musculaire induit par du $BaCl_2$[268]. On peut donc émettre l'hypothèse que l'haptoglobine agit sur cette voie ou sur une des voies de signalisation appartenant à cette famille des MAPK. Afin de mettre en évidence le potentiel rôle d'une de ces voies après un traitement à l'haptoglobine, il serait intéressant de réaliser un phospho-protéome au sein des cellules myogéniques en sélectionnant, dans un premier temps, les voies impliquées dans la régénération musculaire. Une fois l'identification des voies de signalisation impliquées réalisée, il serait judicieux de traiter des souris avec un inhibiteur de la p38-MAPK ou ERK1/2 lors d'un protocole de régénération *in vivo* mais également de traiter des cellules satellites avec le même inhibiteur *in vitro* lors d'un traitement à l'haptoglobine afin de mettre en évidence le rôle d'une de ces voies dans la perte des capacités de régénération observée après un traitement à l'haptoglobine.

Il est également possible que l'haptoglobine agisse sur une autre voie impliquée dans le processus de régénération musculaire. Compte tenu des résultats démontrant l'effet de l'haptoglobine sur l'augmentation de la prolifération des cellules satellites ou encore sur l'inhibition de la différenciation des cellules C2C12, il serait intéressant de déterminer l'activation des voies NOTCH et WNT lors de ce processus. En effet, il est désormais bien identifié que la voie NOTCH est une voie activatrice de la prolifération des cellules musculaires[174] alors que la voie WNT est plus activée dans les phases plus tardives et permet d'initier la différenciation musculaire[183]. La transition entre ces deux voies antagonistes est primordiale pour une régénération musculaire optimale[175]. De ce fait, on peut poser l'hypothèse que l'haptoglobine, lors du processus de régénération musculaire, induit soit une activation prolongée de la voie NOTCH conduisant à une augmentation de la prolifération et une inhibition de la différenciation,

soit une inhibition de la voie WNT qui induirait un retard dans la différenciation musculaire. Afin de savoir si l'une des deux voies est également impliquée, nous allons procéder à un séquençage des ARNs extraits de muscles lésés de souris traitées ou non par de l'haptoglobine. Cette expérience nous permettra d'identifier quelles sont les voies modifiées avec le traitement. Ce résultat sera alors confirmé par une étude protéique des voies potentiellement activées ainsi que par des stratégies pharmacologique ou génique de blocage de ces voies.

En parallèle des investigations sur la voie de signalisation impliquée, il sera essentiel d'étudier quel récepteur est responsable des effets observés. L'étude menée par Blanc et ses collaborateurs démontre que les cellules satellites acquièrent le récepteur CCR2 dans les premiers jours après une blessure musculaire. La présence de ce récepteur à ce stade du processus de régénération musculaire induit une inhibition de la différenciation musculaire, *via* la voie p38-MAPK[268]. De plus, ces travaux ont montré qu'avec l'âge, les cellules satellites maintiennent l'expression de ce récepteur au cours d'une régénération musculaire et soutiennent donc l'inhibition de la différenciation musculaire associée[268]. A la lumière de cette étude, nos résultats soulèvent donc l'hypothèse que l'haptoglobine, *via* son récepteur CCR2 présent sur les cellules satellites, induit également un défaut dans la myogenèse, observé par un retard de différenciation des cellules, une expression diminuée de certains gènes de la myogenèse et une fonction musculaire diminuée 14 jours après la lésion.

Dans un objectif de développement de stratégie thérapeutique ciblant ce récepteur, il sera tout d'abord nécessaire de confirmer les résultats de l'étude menée en 2021[268] quant à la présence de ce récepteur sur les cellules satellites au cours d'une régénération musculaire et avec l'âge *via* la technique du « *simple western* » ou par cytométrie en flux. Ensuite, afin de mettre en évidence la sollicitation de ce récepteur par l'haptoglobine, il serait judicieux d'inhiber ce récepteur grâce à un inhibiteur à petite molécule BMS CCR2 22 (= CCR2i). Cet inhibiteur permet de créer une liaison compétitive, rendant le récepteur stable mais inactif[363]. Si le traitement à l'haptoglobine n'induit pas d'altération de la régénération et de la myogenèse en présence de cet inhibiteur, cette stratégie nous permettrait de mettre en évidence la spécificité du récepteur dans les altérations de l'haptoglobine observées lors d'une régénération musculaire.

Nous avons également étudié le rôle d'une augmentation d'haptoglobine plasmatique sur l'inflammation pendant une régénération musculaire. Pour rappel, les deux récepteurs connus à ce jour de l'haptoglobine se retrouvent sur les cellules inflammatoires (neutrophiles et monocytes) qui s'infiltrent dans le muscle lors d'une blessure mais également sur les macrophages, cellules essentielles pour le processus de régénération. Cependant, de manière étonnante, nous avons observé la même proportion de cellules inflammatoires (neutrophiles, macrophage M1 et M2) lors d'une régénération chez nos souris traitées avec de l'haptoglobine ou un véhicule. En effet, compte tenu de la diminution de l'expression des cytokines pro et anti-inflammatoires suite à un traitement à l'haptoglobine, il aurait été envisageable que l'haptoglobine induise une diminution de la présence des populations inflammatoires dans le muscle lésé en bloquant l'infiltration de ces cellules par liaison sur le récepteur CCR2, soit augmenterait la présence de celles-ci en agissant comme une molécule chimio-attractive au sein du muscle au même titre qu'elle le fait avec les monocytes au sein du tissu adipeux[336]. Cependant, nos résultats ne nous permettent pas de conclure sur un potentiel rôle de l'haptoglobine sur la phase inflammatoire pendant une régénération musculaire. Dans ce contexte, nous proposons donc de mieux caractériser ce rôle en réalisant un marquage sur coupe de muscle à différents temps de la régénération pour observer les macrophages et les neutrophiles. Dans un second temps, nous souhaitons étudier les effets directs de l'haptoglobine sur une culture d'une lignée de macrophages naïfs afin d'étudier l'orientation phénotypique M1 ou M2. Ces expériences pourraient, par la suite, être reproduites sur des macrophages issus d'un muscle en régénération afin de tenir compte des spécificités de ces cellules. Enfin, nous pouvons également étudier, *in vivo*, la sécrétion des différentes cytokines inflammatoires (telles que l'IL-6, l'IL1-β, le TNF-α, l-IL-10, décrites comme essentielles pour la régénération musculaire) par les macrophages musculaires. De plus, le séquençage des ARNs extraits de muscles lésés de souris traitées ou non par de l'haptoglobine nous permettra d'avoir une idée de l'impact de l'haptoglobine sur les différents gènes impliquées dans les étapes de l'inflammation.

Nous avons pu observer chez des souris âgées de 12 mois que, lors d'un processus de régénération musculaire, le traitement à l'haptoglobine induisait des effets moins marqués que chez des souris âgées de 3 mois. Ce résultat peut être expliqué par plusieurs hypothèses. Tout d'abord, nous avons pu observer que le

traitement à l'haptoglobine régulait l'expression génique des récepteurs CCR2 et CD163 ainsi que sa propre expression lors d'un processus de régénération musculaire chez des souris âgées de 3 mois. Or, cette régulation est perdue chez des souris âgées de 12 mois. Cet effet moins marqué de l'haptoglobine chez les souris âgées de 12 mois peut être expliqué dans le choix de la dose d'haptoglobine. En effet, il est possible que malgré le fait que nos calculs et que la quantification montre une augmentation de l'haptoglobinémie comparable à cette retrouvée chez des souris de 24 mois, elle ne soit pas suffisante pour induire les effets pourtant retrouvés chez la souris plus jeune. Il serait donc judicieux d'utiliser des doses plus importantes chez ces souris.

Enfin, pour rappel, Maffei et ses collaborateurs en 2014 avaient décrit un rôle de l'haptoglobine sur le muscle squelettique. Des souris déficientes pour cette glycoprotéine présentent une altération musculaire conduisant à une atrophie due à une défaillance des systèmes anti-oxydants. Ce résultat est exacerbé lors d'un challenge comme l'utilisation d'un régime riche en graisse ou encore d'un protocole d'endurance. Ces challenges impliquent le muscle et plus précisément le système anti-oxydant du muscle, qui est défaillant chez ces souris à l'état basal[358]. Dans ces travaux de thèse, nous montrons qu'une augmentation de l'haptoglobine n'altère pas les fibres matures du muscle squelettique. Il serait donc intéressant de vérifier l'état de ces systèmes lors d'une augmentation d'haptoglobine mimée dans notre étude, sans l'induction de la régénération musculaire. Enfin, il est important de noter que la régénération induite par l'injection de cardiotoxine est un processus bien particulier au sein du muscle mettant en jeux les cellules myogéniques mais également d'autres types cellulaires comme les cellules inflammatoires. Tout cela rend très difficilement comparable ce processus à un challenge comme de l'endurance ou l'utilisation d'un régime riche en graisse. De ce fait, comparer les résultats obtenus lors de notre étude à ceux obtenus par Maffei et ses collaborateurs ne semble pas être la meilleure approche pour définir le rôle de l'haptoglobine sur le muscle squelettique. Pour ce faire, il faudrait étudier la régénération musculaire chez des souris déficientes en haptoglobine.

- **L'haptoglobine : potentiel facteur circulant lié au vieillissement et à la fragilité**

L'haptoglobine, protéine délétère par et pour le tissu adipeux

Comme évoqué précédemment, une étude au sein du laboratoire a pu mettre en évidence une augmentation de l'haptoglobine dans le plasma mais également dans le tissu adipeux des souris au cours du vieillissement. Cette étude a permis également de démontrer que l'augmentation observée avec l'âge dans le tissu adipeux blanc est liée à la sénescence de ce tissu et plus précisément à la protéine p16. Enfin, ces travaux démontrent également que l'haptoglobine adipocytaire a un effet autocrine délétère sur le tissu adipeux blanc. Elle induit une perte des fonctions métaboliques de ce tissu. En effet, les souris traitées à l'haptoglobine présentent une augmentation de l'expression des gènes de l'inflammation et de la sénescence, associée à des altérations fonctionnelles, observée par une diminution de la fonction de lipolyse du tissu adipeux blanc (cf **Figure 13** en introduction -datas non publiées).

On peut donc conclure avec cette étude que l'haptoglobine participe aux altérations du tissu adipeux blanc observées avec le vieillissement.

L'haptoglobine, potentiel facteur circulant marqueur de la fragilité ?

Cette protéine, sécrétée de manière plus importante au cours du vieillissement, participe aux altérations du tissu adipeux blanc et du muscle squelettique liées au vieillissement. De cette manière, cette protéine pourrait compléter la liste des facteurs circulants qui ont été corrélés au vieillissement et plus précisément au syndrome de fragilité. Dans cette liste, nous pouvons retrouver des protéines de l'inflammation (comme le TNF-α, l'IL-6 et la CRP[364,374]), des hormones (telles que la testostérone[367], l'IGF-1 et la vitamine D[368,369]) ou encore des facteurs composant le sérum (comme l'hémoglobine[370]). De plus, d'autres études ont apporté la preuve que les indicateurs des produits finaux de l'oxydation sont également présents sur cette liste et sont associés à la fragilité et ses marqueurs[371,372].

Pour tous ces biomarqueurs, leur utilisation autonome comme prédicteur d'un passage d'un état de robustesse à un état de pré-fragilité ou fragilité n'est pas encore réalisable. En effet, les marqueurs de l'inflammation sont augmentés dans le cadre de différentes pathologies infectieuses ou inflammatoires ou encore dans le cadre de

comorbidité. Cette observation est également retrouvée pour les facteurs circulants. Enfin, l'utilisation des facteurs hormonaux est compliquée puisqu'il existe une grande variabilité entre les individus en situation basale. Afin de se servir de ces facteurs circulants dans la prédiction de la fragilité, des études complémentaires doivent être réalisées afin de placer un seuil.

De manière générale, les différents marqueurs de la fragilité déjà définis ainsi que l'haptoglobine pourraient être utilisés en association pour un meilleur diagnostic et une meilleure prédiction. Aujourd'hui, avoir cette liste à jour, le seuil défini ainsi que les associations possibles est essentiel pour prédire le passage d'un état de robustesse à un état de fragilité afin de mettre en place des stratégies cliniques pour ralentir la survenue et le développement de la fragilité.

- **Le tissu adipeux blanc : un organe clé dans l'apparition de cet état de fragilité et dépendance**

Le tissu adipeux blanc est l'un des organes impactés par le vieillissement. La perte des fonctions de ce tissu est notamment due à une accumulation excessive de cellules sénescentes[373]. L'hypothèse admise aujourd'hui est l'activation de la voie p53/p21 suite à des dommages, entrainant une expression accrue de la β-galactosidase et une sénescence[374]. Longtemps considérées comme inactives, il est admis aujourd'hui que les cellules sénescentes libèrent différents facteurs qui leur est propre. Ce sécrétome est connue aujourd'hui sous le nom de SASP (= *senescent-associated secretory phenotype*). Ce sécrétome est composé de différents facteurs pro-inflammatoires, de chimiokines, de métalloprotéases ou encore de facteurs de croissance. Pour rappel, une étude menée au sein du laboratoire avant mes travaux de thèse semble démontrer que l'augmentation de l'haptoglobine dans le tissu adipeux blanc viscéral et la sénescence des adipocytes composant ce tissu sont liées puisqu'une induction de la sénescence dans les adipocytes induit une augmentation de l'haptoglobine *in vitro*. A *contrario* un traitement par l'haptoglobine sur des adipocytes induit l'expression de marqueurs de la sénescence (**Figure 14**). De cette manière, on peut penser que l'haptoglobine, sur produite par l'adipocyte du tissu adipeux blanc viscéral au cours du vieillissement fait partie du SASP.

Toutes ces modifications sécrétoires impactent la physiologie des organes voisins et participent à la perte des fonctions essentielles pour maintenir l'homéostasie tissulaire. En effet, une étude menée en 2018 démontre que la sécrétion de l'ostéopontine (= OPN) par le tissu adipeux altère la physiologie cardiaque. Ces travaux soulignent, dans un premier temps, que chez des souris âgées, le tissu adipeux blanc viscéral est une des principales sources d'OPN, induisant une diminution de la sénescence des fibroblastes cardiaques, une activation des myofibroblastes et une production plus importante de matrice extra-cellulaire conduisant à une fibrose et des dysfonctions cardiaques. De plus, l'absence de tissu adipeux blanc viscéral ou une déficience pour l'OPN chez des souris induit une amélioration de ces différents marqueurs de fibrose et de fonctions cardiaques[375]. En plus d'une action sur la physiologie cardiaque, les sécrétions du tissu adipeux blanc avec l'âge peuvent atteindre d'autres fonctions comme des fonctions cérébrales[376] et respiratoires. Concernant les fonctions cérébrales, le cerveau est un organe protégé au sein de l'organisme, *via* la barrière hémato-encéphalique. Les modifications des sécrétions pro-inflammatoires (comme pour l'IL1-β, le TNF-α) du tissu adipeux blanc viscéral au cours du vieillissement altère cette barrière, observée par une diminution des jonctions serrées et une augmentation de l'extravasation des IgG au sein du cerveau. Cette altération entraine une activation des cellules inflammatoires résidentes du cerveau : la microglie, ainsi qu'une augmentation des cytokines pro-inflammatoires au niveau local[376]. Cette étude démontre donc que, *via* ses sécrétions, le tissu adipeux blanc est associé aux changements au niveau cérébral et aux lésions ischémiques liés à l'âge[376]. De plus, d'autres études réalisées chez l'homme soulignent qu'il existe une association entre l'accumulation des tissus adipeux blancs et les altérations cognitives. En effet, une accumulation excessive de tissu adipeux viscéral est négativement corrélée à une diminution du volume de matière grise sous-corticale, du volume hippocampique et à une altération de la mémoire[377]. Enfin, d'après une étude réalisée également chez l'homme, les dépôts de tissu adipeux blanc au niveau viscéral peuvent accélérer le déclin des fonctions respiratoires lié à l'âge[378].

Compte tenu de nos résultats décrivant le rôle de l'haptoglobine sur le muscle squelettique et la régénération de ce tissu, nos travaux apportent une preuve supplémentaire que les changements sécrétoires du tissu adipeux blanc observés au cours du vieillissement participent de manière non négligeable aux altérations des

fonctions musculaires, en plus des altérations cardiaques, cérébrales et respiratoires déjà décrites dans la littérature.

Le tissu adipeux peut également impacter la physiologie du muscle squelettique et plus précisément la régénération musculaire, *via* les processus de migration cellulaire. En effet, une étude publiée en 2023 démontre que les cellules adipeuses stromales sont capables de migrer au sein d'un muscle lésé afin d'améliorer la régénération musculaire, chez des souris jeunes[379]. Cependant, des études plus poussées sont nécessaires pour déterminer ce processus au cours du vieillissement mais on peut penser que la migration des cellules stromales adipeuses avec l'âge est amoindrie, participant à la diminution des capacités régénératives.

Ainsi tous ces changements au niveau sécrétoire et morphologique du tissu adipeux blanc altèrent potentiellement les capacités fonctionnelles nécessaires pour vieillir en bonne santé. Il apparait donc essentiel de mettre en place des stratégies préventives afin de contrer toutes ces altérations.

- **<u>Importance du maintien du tissu adipeux blanc avec l'âge : les stratégies développées et connues à ce jour</u>**

Étant donné l'implication du tissu adipeux blanc dans les désordres liés à l'âge, ainsi que le lien existant entre l'haptoglobine et la sénescence de ce tissu, il nous semble judicieux d'arriver à maitriser son vieillissement et à diminuer sa sénescence afin de maitriser ses sécrétions d'haptoglobine et de limiter l'altération liée au vieillissement des capacités de régénération musculaire.

Depuis quelques années, dans la littérature, différentes stratégies ont été élaborées afin de maitriser la sénescence du tissu adipeux blanc. Bien qu'elles ne soient pas spécifiques du tissu adipeux blanc, elles ont montré de réels effets sur celui-ci. Ces interventions résident sur i) une action pharmacologique, ii) une action sur le mode vie ou iii) une approche génique.

Concernant l'approche pharmacologique, plusieurs études utilisent une combinaison de sénolytiques (Dasatinib+Quercitine) afin d'atténuer les dysfonctions observées avec l'âge. Les sénolytiques sont des molécules permettant d'éliminer les

cellules sénescentes en induisant leur apoptose. Cette stratégie permet d'améliorer, en autre, le vieillissement du tissu adipeux avec une diminution de l'accumulation de cellules sénescentes et des sécrétions pro-inflammatoires[380]. L'utilisation de sénolytiques permet, à terme, d'améliorer la durée de vie ainsi que des fonctions essentielles pour lutter contre la dépendance comme les fonctions motrices et physiques[381]. Un autre traitement pharmacologique possible est la metformine. Ce médicament, utilisé habituellement dans le cas du diabète de type II a montré un réel potentiel contre la lutte de la présence des cellules sénescentes et des dysfonctions du tissu adipeux blanc[382]. Concernant les approches impactant le mode de vie, des expériences de restriction calorique ont montré leurs effets sur l'accumulation de tissu adipeux blanc et de ses altérations avec l'âge. En effet, une restriction calorique de 25% de 24 mois sur une cohorte humaine a permis d'augmenter la qualité de vie[383]. Selon les auteurs, cette approche permettrait de moduler différents acteurs responsables des altérations observées au cours du vieillissement et de compenser la diminution de l'activité de mTOR ou encore de réduire les gènes du métabolisme lipidique dans le tissu adipeux blanc[384]. Enfin, certaines études proposent la thérapie génique comme stratégie pour lutter contre le vieillissement du tissu adipeux en ciblant différents candidats ($NIRP_1$[385] ou encore les récepteurs Tol II[386]). Cependant, cette approche reste très controversée et difficilement applicable à l'homme.

Dans le cadre de mon doctorat, afin d'apporter la preuve de concept de l'importance de ce tissu et de l'haptoglobine adipocytaire dans notre étude, il serait envisageable de réaliser des lipectomies du tissu adipeux viscéral et de regarder les conséquences sur différents paramètres mesurés de la régénération musculaire (les fonctions musculaires ou encore expression génique de la myogenèse). Cependant, cette expérience ne serait pas envisageable à l'homme. Dans un souci de translation clinique, nous avons décidé d'utiliser une approche nutritionnelle par le jeûne intermittent (= intermittent fasting, IF). Cette stratégie, consistant à un jeûne de 24 heures tous les deux jours, permet de réduire de manière drastique le vieillissement et les dysfonctions associées du tissu adipeux. Pour cela, nous avons soumis des souris âgées de 15 ou 24 mois à un jeune intermittent pendant 4 semaines et réalisé le protocole de régénération musculaire décrit précédemment. Comme illustré dans le **Figure 15A**, le pourcentage de perte de poids chez des souris âgées de 24 mois était plus important dans le groupe en jeûne intermittent par rapport au groupe en *ad libitum*.

Le poids des souris âgées de 15 mois en jeûne intermittent est similaire au poids des souris en *ad libitum*. La glycémie et de la cétonémie après 24 heures de jeûne nous a permis de confirmer le protocole. En effet, malgré le poids similaire dans nos deux groupes de souris âgées de 15 mois, la glycémie à jeun est diminuée après un mois de jeûne intermittent. Chez nos souris âgées de 24 mois, on observe une diminution de la glycémie avec l'âge, indépendamment du régime (**Figure 15B**). Par contre, la cétonémie est augmentée dans le groupe *ad libitum*, quel que soit l'âge de nos souris (**Figure 15C**). Ces trois figures nous permettent de valider le protocole. Cependant, nous avons bien conscience qu'il faudra compléter ces résultats avec des analyses plus poussées (analyse génique) dans les organes affectés par le jeûne intermittent comme les différents tissus adipeux blancs et le foie. Enfin, comme illustré en **Figure 15D**, le jeune intermittent diminue les concentrations plasmatiques d'haptoglobine chez une souris âgée de 15 mois. En accord avec la littérature[387], les effets du jeûne intermittent est moins marqué chez une souris âgée de 24 mois. Il nous reste maintenant à déterminer les conséquences d'une telle diminution sur les capacités régénératives musculaires grâce à des tests fonctionnels et une étude génique. Ce protocole est actuellement en cours.

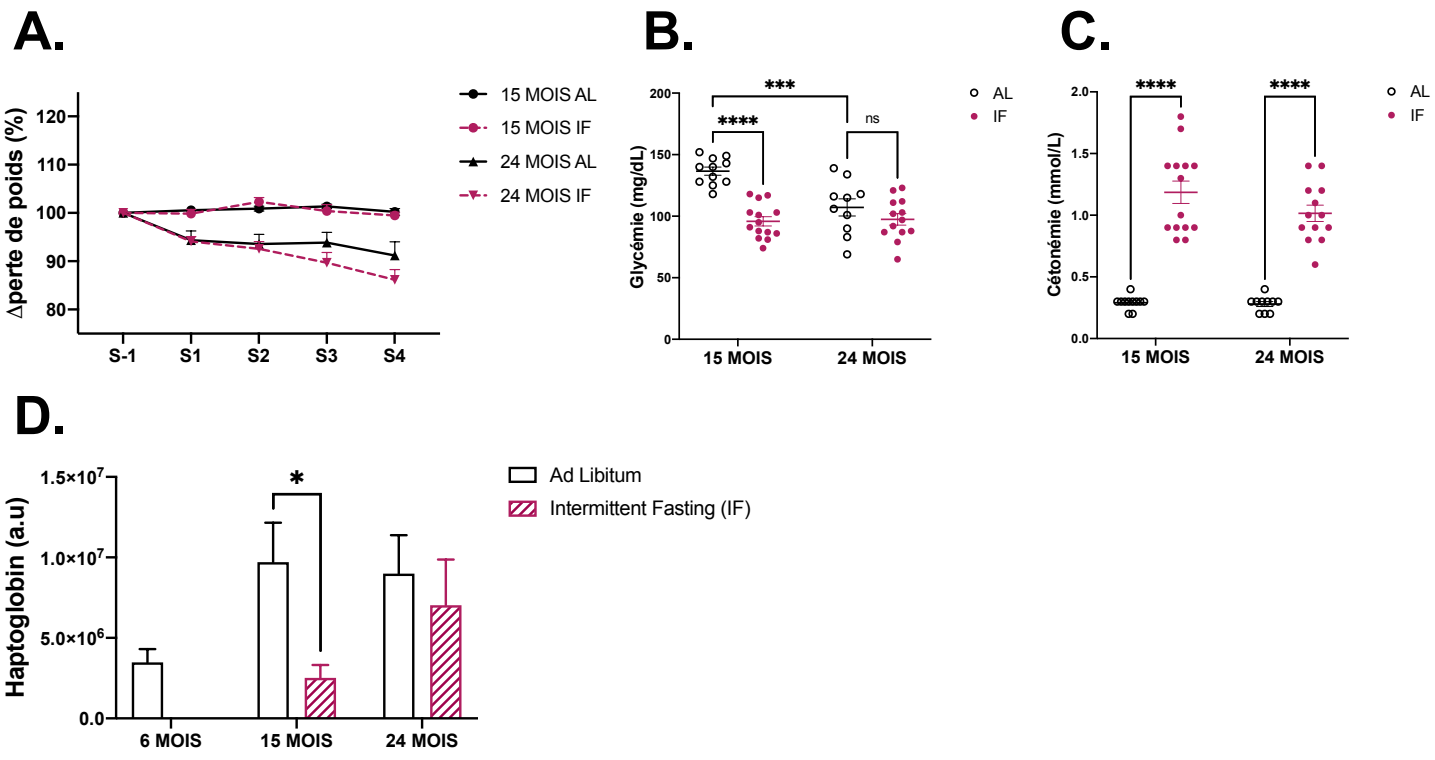


Figure 15 : Effets du jeûne intermittent sur la prise de poids, la glycémie, la cétonémie et l'haptoglobinémie chez des souris âgées de 15 et 24 mois.
(A) Suivi de la prise et perte de poids chez des souris âgées de 15 et 24 mois après 1 mois de jeûne intermittent (n=10-13 par groupe). **(B)** Mesure de la glycémie après 1 mois de jeûne intermittent chez des souris âgées de 15 et 24 mois (n= 10-14 par groupe). **(C)** Mesure de la cétonémie après 1 mois de jeûne intermittent chez des souris âgées de 15 et 24 mois (n= 10-14 par groupe). **(D)** Quantification du Western Blot de l'haptoglobine (Hp) par analyse densitométrique dans le plasma de souris âgées 15 et 24 mois après 1 mois de jeûne intermittent (n = 4-7 par groupe). Datas sont les moyennes means ± s.e.m. *p<0,05 ; ***p<0,001 ; ****p<0,0001. Test de student.

- **Obésité, sarcopénie et régénération musculaire : quel avenir pour cette population ?**

Depuis les années 80, la prévalence de l'obésité ne cesse d'augmenter. Parallèlement, l'augmentation de l'espérance de vie et les modes de vie de plus en plus sédentaires entrainent une augmentation de l'apparition de la sarcopénie dans la population de plus en plus en jeune. De plus, la sarcopénie aggrave les effets néfastes de l'obésité chez les personnes âgées, aboutissant à ce que l'on appelle aujourd'hui la sarcopénie de l'obèse. Cette pathologie est le consensus de deux pathologies : le vieillissement musculaire et l'augmentation de l'obésité. Cependant, la définition actuelle ne repose que sur des définitions individuelles de la sarcopénie et de l'obésité. Il n'existe aucune réelle définition spécifique ce qui rend très difficile le diagnostic précis de la sarcopénie de l'obèse. Cependant, il est connu que le développement d'une des deux pathologies peut augmenter la prévalence de développer la deuxième. Ainsi, l'obésité induit une augmentation de l'infiltration des cellules inflammatoires et la libération par celles-ci de facteurs pro-inflammatoires, participant à l'inflammation de bas bruit[388,389]. Cette inflammation contribue à la perte de la force dans le muscle squelettique, participant au développement de la sarcopénie[390]. De même, la perte musculaire liée à l'âge est accompagnée d'une diminution du métabolisme au repos, associée à une diminution de l'activité physique ou encore des capacités oxydatives au sein du muscle[391]. De manière générale, la diminution des dépenses énergétiques au cours du vieillissement participe à l'augmentation de la masse grasse et à terme de la prévalence de l'obésité. Enfin, au cours de l'installation des deux pathologies, des dépôts adipeux ectopiques de lipides apparaissent dans le muscle squelettique. Ces lipides sont très toxiques pour la cellule musculaire et participent au développement de la sarcopénie[392]. Illustré par ces quelques exemples, la sarcopénie et l'obésité apparaissent comme « liées » par des facteurs communs.

Pour confirmer les liens existants entre ces deux pathologies, il a pu être mis en évidence qu'un modèle d'obésité présentait des altérations dans les processus de régénération musculaire. En effet, un régime gras de longue durée induit une diminution de la masse musculaire, de la taille des fibres et une augmentation du dépôt de collagène après une blessure à la cardiotoxine[382]. De plus, une étude menée en 2011 montre que la prolifération des cellules satellites est également diminuée chez des souris sous régime gras[395]. Il est important de souligner cependant que ces résultats peuvent diverger suivant le type de muscle étudié pendant une régénération musculaire. L'hypothèse privilégiée aujourd'hui reste celle des sécrétions de ce tissu adipeux blanc d'un sujet obèse. En effet, *via* celles-ci, le tissu adipeux peut altérer les fonctions des progéniteurs myogéniques. Des souris déficientes en leptine (= les souris ob/ob) ou des souris déficientes pour le récepteur à la leptine (= souris db/db), présentent une diminution de la prolifération des cellules satellites et l'expression de MyoD, provoquant une réduction des capacités de régénération musculaire dans ces modèles génétiques[396]. Il est connu qu'au cours du vieillissement, la sensibilité à la leptine est diminuée. Cette diminution de sensibilité peut expliquer certaines des altérations du processus de régénération musculaire observées qui sont similaires à celles obtenues chez des souris db/db ou ob/ob. L'inflammation est un autre exemple. Une exposition soutenue à des cytokines pro-inflammatoires (l'IL1-β ou le TNF-α) dans le cadre de différentes pathologies comme des inflammations chroniques pulmonaires induisent des altérations dans les processus de prolifération et différenciation myogéniques[389]. Cette étude, qui souligne le fait qu'une inflammation chronique altère des processus de régénération, nous laisse penser que l'inflammation de bas bruit observée dans le cadre de l'obésité peut avoir un impact non négligeable sur les capacités de régénération musculaire.

Enfin, ce lien existant entre la régénération musculaire et l'obésité a également été fait par Maffei et ses collaborateurs qui démontrent que l'haptoglobine pourrait jouer un rôle dans cette discussion comme déjà décrit dans l'introduction de ce manuscrit[349] Mes travaux de doctorat confirment cette hypothèse en démontrant qu'une augmentation de l'haptoglobine induit un retard de la régénération musculaire et altère les capacités myogéniques des cellules satellites. De ce fait, il n'est pas improbable que l'haptoglobine, libérée par le tissu adipeux de l'obèse, participe de manière importante aux altérations de la régénération musculaire observées chez le sujet obèse, conduisant à développer la sarcopénie de l'obèse.

Enfin, la prévalence de la population de sujet obèse ne cessant d'augmenter, une réelle question va se poser dans l'avenir : comment cette population de personnes obèses va-t-elle vieillir ? En plus du risque associé à l'obésité elle-même, cette population est plus encline à développer de la sarcopénie. En conséquence, la transition vers l'état de fragilité et donc de dépendance sera potentiellement plus précoce chez cette population.

- **La place de la régénération dans le cadre du vieillissement : balance entre cicatrisation/fibrose et régénération**

La régénération est définie comme la capacité à recréer une architecture et les fonctions originales des tissus après avoir subi une lésion, sans laisser de cicatrice. Ce mécanisme est extrêmement présent en biologie mais peut varier en fonction de l'espèce étudiée[397] ou encore de l'âge[398,266].

Chez les mammifères, cette capacité est extrêmement retrouvée au cours du développement mais est perdue en grande majorité à l'âge adulte. Chez le mammifère adulte, on voit apparaitre un phénomène de cicatrisation plus présent que celui de la régénération. Peu d'organes gardent cette faculté de régénération. On y retrouve principalement le foie mais également le muscle squelettique. Cependant, même si le foie ou le muscle squelettique ont cette capacité, le pouvoir de régénération reste très limité chez l'homme. Si le traumatisme est chronique ou trop rapproché, les voies mises en jeux dans la régénération vont être sur-stimulées, entrainant une bascule vers la cicatrisation et donc la fibrose. Cette fibrose, caractérisée par une accumulation excessive des composants de la MEC (cf introduction de ce manuscrit), déforme le tissu, entraine une rigidité du tissu et donc une perte de fonction.

Au cours du vieillissement, ces capacités de régénération dans le foie ou encore dans le muscle squelettique diminuent, entrainant l'apparition de fibrose. Bien que considéré comme un processus définitif, des études réalisées sur le foie ont amené la preuve de la réversibilité de ce processus. En effet, celui-ci est extrêmement plastique et plusieurs stratégies sont envisageables pour maintenir cette capacité dans le cas de blessures chroniques ou au cours du vieillissement. Parmi celles-ci, il serait envisageable i) d'activer l'apoptose des myofibroblastes par des traitements (par exemple l'utilisation de la gliotoxine)[399] ou par l'activation de cellules immunitaires

(cellules dendritiques[400], Natural Killer (= NK)[401]) qui possèdent cette capacité, ii) d'augmenter le nombre de macrophages effectif pour réduire cette fibrose ou iii) d'agir sur le système immunitaire défaillant au cours du vieillissement par inhibition de certaines cytokines/molécules par exemple[402,403].

Bien que le processus de régénération reste encore très controversé quant à son importance au cours du vieillissement ou au cours de différentes pathologies, ces études sur le foie et le muscle squelettique soulignent l'importance de maitriser cette balance entre régénération et fibrose, afin de lutter contre les pertes des fonctions et de plasticité des tissus.

De manière plus générale, mes travaux de thèse ont permis de mettre en évidence plusieurs points. Tout d'abord, l'hyperhaptoglobinémie observée au cours du vieillissement induit un retard des processus de régénération musculaire, se traduisant notamment par une diminution des capacités fonctionnelles musculaires suite à une blessure. Bien qu'il n'existe pas encore de stratégies visant directement l'haptoglobine plasmatique, il serait intéressant de bloquer les actions néfastes des facteurs présents dans le SASP (dont fait potentiellement partie l'haptoglobine) par l'utilisation de sénomorphiques visant à bloquer soit l'haptoglobine soit les récepteurs CCR2 ou CD163. Ces différentes approches permettraient de réduire les effets délétères de l'haptoglobine. En parallèle, il serait envisageable d'utiliser des stratégies plus globales permettant de réduire la sénescence du tissu adipeux *via* l'utilisation de sénolytiques ou d'une approche nutritionelle.

Ensuite, ces travaux de thèse ont pu conforter l'idée que les modifications du tissu adipeux blanc observées au cours du vieillissement altèrent les organes voisins tels que le cœur, le poumon, le cerveau et le muscle. Plus particulièrement, ces travaux démontrent que ce tissu adipeux blanc altéré avec l'âge participe aux altérations des processus de régénération musculaires observées avec le vieillissement. Ainsi il devient primordial de mettre en place, notamment en clinique, des stratégies afin de réduire l'état de sénescence de ce tissu et de revenir à un état proche d'un tissu adipeux « sain » en utilisant par exemple des stratégies alimentaires comme le jeune intermittent.

●●●

BIBLIOGRAPHIES

●●●

BIBLIOGRAPHIE

1. Cruz-Jentoft, A. J. *et al.* Sarcopenia: European consensus on definition and diagnosis: Report of the European Working Group on Sarcopenia in Older People. *Age Ageing* **39**, 412–423 (2010).
2. Janssen, I., Heymsfield, S. B., Baumgartner, R. N. & Ross, R. Estimation of skeletal muscle mass by bioelectrical impedance analysis. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md 1985* **89**, 465–471 (2000).
3. Wielopolski, L. *et al.* Measuring partial body potassium in the arm versus total body potassium. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md 1985* **101**, 945–949 (2006).
4. Lauretani, F. *et al.* Age-associated changes in skeletal muscles and their effect on mobility: an operational diagnosis of sarcopenia. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md 1985* **95**, 1851–1860 (2003).
5. Guralnik, J. M. *et al.* Lower extremity function and subsequent disability: consistency across studies, predictive models, and value of gait speed alone compared with the short physical performance battery. *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* **55**, M221-231 (2000).
6. Clynes, M. A. *et al.* Definitions of Sarcopenia: Associations with Previous Falls and Fracture in a Population Sample. *Calcif. Tissue Int.* **97**, 445–452 (2015).
7. Sutil, D. V. *et al.* Prevalence of sarcopenia in older women and level of agreement between the diagnostic instruments proposed by the European Working Group on Sarcopenia in Older People 2 (EWGSOP2). *BMC Musculoskelet. Disord.* **24**, 182 (2023).
8. Yuan, S. & Larsson, S. C. Epidemiology of sarcopenia: Prevalence, risk factors, and consequences. *Metabolism* 155533 (2023) doi:10.1016/j.metabol.2023.155533.
9. Proud, C. G. mTORC1 signalling and mRNA translation. *Biochem. Soc. Trans.* **37**, 227–231 (2009).
10. Bodine, S. C. *et al.* Akt/mTOR pathway is a crucial regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy in vivo. *Nat. Cell Biol.* **3**, 1014–1019 (2001).
11. Kim, D.-H. *et al.* mTOR Interacts with Raptor to Form a Nutrient-Sensitive Complex that Signals to the Cell Growth Machinery. *Cell* **110**, 163–175 (2002).
12. Nojima, H. *et al.* The Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) Partner, Raptor, Binds the mTOR Substrates p70 S6 Kinase and 4E-BP1 through Their TOR Signaling (TOS) Motif. *J. Biol. Chem.* **278**, 15461–15464 (2003).
13. Holz, M. K. & Blenis, J. Identification of S6 Kinase 1 as a Novel Mammalian Target of Rapamycin (mTOR)-phosphorylating Kinase. *J. Biol. Chem.* **280**, 26089–26093 (2005).
14. Hara, K. *et al.* Regulation of eIF-4E BP1 Phosphorylation by mTOR. *J. Biol. Chem.* **272**, 26457–26463 (1997).
15. Brunn, G. J. *et al.* Phosphorylation of the Translational Repressor PHAS-I by the Mammalian Target of Rapamycin. *Science* **277**, 99–101 (1997).
16. Sabers, C. J. *et al.* Isolation of protein target of the FKBP12-Rapamycin complex in mammalian cells.pdf. *The Journal of Biological Chemistry* 815–822 (1995).
17. Choo, A. Y., Yoon, S.-O., Kim, S. G., Roux, P. P. & Blenis, J. Rapamycin differentially inhibits S6Ks and 4E-BP1 to mediate cell-type-specific repression of mRNA translation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **105**, 17414–17419 (2008).
18. Beretta, L., Gingras, A. C., Svitkin, Y. V., Hall, M. N. & Sonenberg, N. Rapamycin blocks the phosphorylation of 4E-BP1 and inhibits cap-dependent initiation of translation. *EMBO J.* **15**, 658–664 (1996).
19. Price, D., Grove, Calvo, V., Avruch, J. & Bierer, B. Rapamycin-induced inhibition of

the 70-kilodalton S6 protein kinase. *Science* **257**, 973–977 (1992).
20. Chung, J., Kuo, C. J., Crabtree, G. R. & Blenis, J. Rapamycin-FKBP specifically blocks growth-dependent activation of and signaling by the 70 kd S6 protein kinases. *Cell* **69**, 1227–1236 (1992).
21. Jefferson, L. S., Fabian, J. R. & Kimball, S. R. Glycogen synthase kinase-3 is the predominant insulin-regulated eukaryotic initiation factor 2B kinase in skeletal muscle. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **31**, 191–200 (1999).
22. Cross, D. A. E., Alessi, D. R., Cohen, P., Andjelkovich, M. & Hemmings, B. A. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature* **378**, 785–789 (1995).
23. Goodman, N. & Goldberg, L. Role of Different Proteolytic Systems in the Degradation of Muscle Proteins during Denervation Atrophy. 9.
24. Bochtler, M., Ditzel, L., Groll, M., Hartmann, C. & Huber, R. THE PROTEASOME. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 295–317 (1999).
25. Gomes, M. D., Lecker, S. H., Jagoe, R. T., Navon, A. & Goldberg, A. L. Atrogin-1, a muscle-specific F-box protein highly expressed during muscle atrophy. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98**, 14440–14445 (2001).
26. Bodine, S. C. Identification of Ubiquitin Ligases Required for Skeletal Muscle Atrophy. *Science* **294**, 1704–1708 (2001).
27. Tintignac, L. A. *et al.* Degradation of MyoD Mediated by the SCF (MAFbx) Ubiquitin Ligase. *J. Biol. Chem.* **280**, 2847–2856 (2005).
28. Clarke, B. A. *et al.* The E3 Ligase MuRF1 Degrades Myosin Heavy Chain Protein in Dexamethasone-Treated Skeletal Muscle. *Cell Metab.* **6**, 376–385 (2007).
29. Lokireddy, S. *et al.* Identification of atrogin-1-targeted proteins during the myostatin-induced skeletal muscle wasting. *Am. J. Physiol.-Cell Physiol.* **303**, C512–C529 (2012).
30. Ravikumar, B. *et al.* Regulation of Mammalian Autophagy in Physiology and Pathophysiology. *Physiol. Rev.* **90**, 1383–1435 (2010).
31. Pankiv, S. *et al.* p62/SQSTM1 Binds Directly to Atg8/LC3 to Facilitate Degradation of Ubiquitinated Protein Aggregates by Autophagy. *J. Biol. Chem.* **282**, 24131–24145 (2007).
32. Furuta, N., Fujita, N., Noda, T., Yoshimori, T. & Amano, A. Combinational Soluble *N* -Ethylmaleimide-sensitive Factor Attachment Protein Receptor Proteins VAMP8 and Vti1b Mediate Fusion of Antimicrobial and Canonical Autophagosomes with Lysosomes. *Mol. Biol. Cell* **21**, 1001–1010 (2010).
33. Stitt, T. N. *et al.* The IGF-1/PI3K/Akt Pathway Prevents Short Article Expression of Muscle Atrophy-Induced Ubiquitin Ligases by Inhibiting FOXO Transcription Factors. *Mol. Cell* 9.
34. Sandri, M. *et al.* Foxo Transcription Factors Induce the Atrophy-Related Ubiquitin Ligase Atrogin-1 and Cause Skeletal Muscle Atrophy. *Cell* **117**, 399–412 (2004).
35. Kim, J., Kundu, M., Viollet, B. & Guan, K.-L. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat. Cell Biol.* **13**, 132–141 (2011).
36. Wojtaszewski, J. F. P., Nielsen, P., Hansen, B. F., Richter, E. A. & Kiens, B. Isoform-specific and exercise intensity-dependent activation of 5Ÿ-AMP-activated protein kinase in human skeletal muscle. *J Physiol* 6.
37. Corton, J. M., Gillespie, J. G., Hawley, S. A. & Hardie, D. G. 5-Aminoimidazole-4-Carboxamide Ribonucleoside. A Specific Method for Activating AMP-Activated Protein Kinase in Intact Cells? *Eur. J. Biochem.* **229**, 558–565 (1995).
38. Vavvas, D. *et al.* Contraction-induced Changes in Acetyl-CoA Carboxylase and 5′-AMP-activated Kinase in Skeletal Muscle. *J. Biol. Chem.* **272**, 13255–13261 (1997).
39. Inoki, K., Zhu, T. & Guan, K.-L. TSC2 Mediates Cellular Energy Response to Control Cell Growth and Survival. *Cell* **115**, 577–590 (2003).

40. Gwinn, D. M. *et al.* AMPK Phosphorylation of Raptor Mediates a Metabolic Checkpoint. *Mol. Cell* **30**, 214–226 (2008).
41. Sanchez, A. M. *et al.* AMPK promotes skeletal muscle autophagy through activation of forkhead FoxO3a and interaction with Ulk1. *J. Cell. Biochem.* **113**, 695–710 (2012).
42. Nakashima, K. & Yakabe, Y. AMPK Activation Stimulates Myofibrillar Protein Degradation and Expression of Atrophy-Related Ubiquitin Ligases by Increasing FOXO Transcription Factors in C2C12 Myotubes. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **71**, 1650–1656 (2007).
43. Mittal, A. *et al.* The TWEAK–Fn14 system is a critical regulator of denervation-induced skeletal muscle atrophy in mice. *J. Cell Biol.* **188**, 833–849 (2010).
44. Cai, D. *et al.* IKK␣/NF-□B Activation Causes Severe Muscle Wasting in Mice. 14.
45. Bernardi, H. *et al.* Wnt4 activates the canonical β-catenin pathway and regulates negatively myostatin: functional implication in myogenesis. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **300**, C1122-1138 (2011).
46. von Maltzahn, J., Bentzinger, C. F. & Rudnicki, M. A. Wnt7a–Fzd7 signalling directly activates the Akt/mTOR anabolic growth pathway in skeletal muscle. *Nat. Cell Biol.* **14**, 186–191 (2012).
47. Heydari, A. R., Takahashi, R., Gutsmann, A., You, S. & Richardson, A. Hsp70 and aging. *Experientia* (1994).
48. Vasilaki, A., Jackson, M. J. & McArdle, A. Attenuated HSP70 response in skeletal muscle of aged rats following contractile activity. *Muscle Nerve* **25**, 902–905 (2002).
49. McArdle, A., H. Dillmann, W., Mestril, R., A. Faulkner, J. & J. Jackson, M. Overexpression of HSP70 in mouse skeletal muscle protects against muscle damage and age-related muscle dysfunction. *FASEB J.* **18**, 1–12 (2004).
50. Mohamed, J. S., Wilson, J. C., Myers, M. J., Sisson, K. J. & Alway, S. E. Dysregulation of SIRT-1 in aging mice increases skeletal muscle fatigue by a PARP-1-dependent mechanism. *Aging* **6**, 820–834 (2014).
51. Hars, E. S. *et al.* Autophagy Regulates Ageing in *C. elegans*. *Autophagy* **3**, 93–95 (2007).
52. Simonsen, A. *et al.* Promoting basal levels of autophagy in the nervous system enhances longevity and oxidant resistance in adult Drosophila. *Autophagy* **4**, 176–184 (2008).
53. Paturi, S. *et al.* Effects of aging and gender on muscle mass and regulation of Akt-mTOR-p70s6k related signaling in the F344BN rat model. *Mech. Ageing Dev.* **131**, 202–209 (2010).
54. Funai, K., Parkington, J. D., Carambula, S. & Fielding, R. A. Age-associated decrease in contraction-induced activation of downstream targets of Akt/mTor signaling in skeletal muscle. *Am. J. Physiol.-Regul. Integr. Comp. Physiol.* **290**, R1080–R1086 (2006).
55. Wu, M. *et al.* Aging-Associated Dysfunction of Akt/Protein Kinase B: S-Nitrosylation and Acetaminophen Intervention. *PLoS ONE* **4**, e6430 (2009).
56. Clavel, S. *et al.* Atrophy-related ubiquitin ligases, atrogin-1 and MuRF1 are up-regulated in aged rat Tibialis Anterior muscle. *Mech. Ageing Dev.* **127**, 794–801 (2006).
57. Edstrom, E., Altun, M., Hagglund, M. & Ulfhake, B. Atrogin-1/MAFbx and MuRF1 Are Downregulated in Aging-Related Loss of Skeletal Muscle. *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* **61**, 663–674 (2006).
58. Reznick, R. M. *et al.* Aging-Associated Reductions in AMP-Activated Protein Kinase Activity and Mitochondrial Biogenesis. *Cell Metab.* **5**, 151–156 (2007).
59. Sandri, M. *et al.* PGC-1 protects skeletal muscle from atrophy by suppressing FoxO3 action and atrophy-specific gene transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103**, 16260–16265 (2006).
60. Wu, Z. *et al.* Mechanisms Controlling Mitochondrial Biogenesis and Respiration

through the Thermogenic Coactivator PGC-1. *Cell* **98**, 115–124 (1999).
61. Larsson, N.-G. *et al.* Mitochondrial transcription factor A is necessary for mtDNA maintenance and embryogenesis in mice. **18**, 6 (1998).
62. Mihara, K. & Omura, T. Cytoplasmic chaperones in precursor targeting to mitochondria: the role of MSF and hsp 70. *Trends Cell Biol.* **6**, 104–108 (1996).
63. Smirnova, E., Griparic, L., Shurland, D.-L. & van der Bliek, A. M. Dynamin-related Protein Drp1 Is Required for Mitochondrial Division in Mammalian Cells. *Mol. Biol. Cell* **12**, 2245–2256 (2001).
64. Otera, H. *et al.* Mff is an essential factor for mitochondrial recruitment of Drp1 during mitochondrial fission in mammalian cells. *J. Cell Biol.* **191**, 1141–1158 (2010).
65. James, D. I., Parone, P. A., Mattenberger, Y. & Martinou, J.-C. hFis1, a Novel Component of the Mammalian Mitochondrial Fission Machinery. *J. Biol. Chem.* **278**, 36373–36379 (2003).
66. Song, Z., Ghochani, M., McCaffery, J. M., Frey, T. G. & Chan, D. C. Mitofusins and OPA1 Mediate Sequential Steps in Mitochondrial Membrane Fusion. *Mol. Biol. Cell* **20**, 3525–3532 (2009).
67. Cipolat, S., de Brito, O. M., Dal Zilio, B. & Scorrano, L. OPA1 requires mitofusin 1 to promote mitochondrial fusion. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **101**, 15927–15932 (2004).
68. Picard, M., White, K. & Turnbull, D. M. Mitochondrial morphology, topology, and membrane interactions in skeletal muscle: a quantitative three-dimensional electron microscopy study. *J. Appl. Physiol.* **114**, 161–171 (2013).
69. Ferreira, R. *et al.* Subsarcolemmal and intermyofibrillar mitochondria proteome differences disclose functional specializations in skeletal muscle. *PROTEOMICS* **10**, 3142–3154 (2010).
70. Geisler, S. *et al.* PINK1/Parkin-mediated mitophagy is dependent on VDAC1 and p62/SQSTM1. *Nat. Cell Biol.* **12**, 119–131 (2010).
71. Leduc-Gaudet, J.-P. *et al.* Mitochondrial morphology is altered in atrophied skeletal muscle of aged mice. *Oncotarget* **6**, 17923–17937 (2015).
72. Gouspillou, G. *et al.* Mitochondrial energetics is impaired *in vivo* in aged skeletal muscle. *Aging Cell* **13**, 39–48 (2014).
73. Short, K. R. *et al.* Decline in skeletal muscle mitochondrial function with aging in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **102**, 5618–5623 (2005).
74. Kwong, L. K. & Sohal, R. S. Age-Related Changes in Activities of Mitochondrial Electron Transport Complexes in Various Tissues of the Mouse. *Arch. Biochem. Biophys.* **373**, 16–22 (2000).
75. Gouspillou, G. *et al.* Alteration of mitochondrial oxidative phosphorylation in aged skeletal muscle involves modification of adenine nucleotide translocator. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* **1797**, 143–151 (2010).
76. Betik, A. C., Thomas, M. M., Wright, K. J., Riel, C. D. & Hepple, R. T. Exercise training from late middle age until senescence does not attenuate the declines in skeletal muscle aerobic function. *Am. J. Physiol.-Regul. Integr. Comp. Physiol.* **297**, R744–R755 (2009).
77. Gouspillou, G. *et al.* Increased sensitivity to mitochondrial permeability transition and myonuclear translocation of endonuclease G in atrophied muscle of physically active older humans. *FASEB J.* **28**, 1621–1633 (2014).
78. Lefaucheur, J. P. & Sébille, A. The cellular events of injured muscle regeneration depend on the nature of the injury. *Neuromuscul. Disord. NMD* **5**, 501–509 (1995).
79. Carlson. Development of contractile properties of minced muscle regenerates in the rat - PubMed. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/5053353/ (1972).
80. Chargé, S. B. P. & Rudnicki, M. A. Cellular and Molecular Regulation of Muscle

Regeneration. *Physiol. Rev.* **84**, 209–238 (2004).
81. Mauro, A. SATELLITE CELL OF SKELETAL MUSCLE FIBERS. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **9**, 493–495 (1961).
82. Seale, P. *et al.* Pax7 Is Required for the Specification of Myogenic Satellite Cells. *Cell* **102**, 777–786 (2000).
83. Beauchamp, J. R. *et al.* Expression of Cd34 and Myf5 Defines the Majority of Quiescent Adult Skeletal Muscle Satellite Cells. *J. Cell Biol.* **151**, 1221–1234 (2000).
84. Cornelison, D. D. W., Filla, M. S., Stanley, H. M., Rapraeger, A. C. & Olwin, B. B. Syndecan-3 and Syndecan-4 Specifically Mark Skeletal Muscle Satellite Cells and Are Implicated in Satellite Cell Maintenance and Muscle Regeneration. *Dev. Biol.* **239**, 79–94 (2001).
85. Irintchev, A., Zeschnigk, M., Starzinski-Powitz, A. & Wernig, A. Expression pattern of M-cadherin in normal, denervated, and regenerating mouse muscles. *Dev. Dyn.* **199**, 326–337 (1994).
86. Kuang, S., Kuroda, K., Le Grand, F. & Rudnicki, M. A. Asymmetric Self-Renewal and Commitment of Satellite Stem Cells in Muscle. *Cell* **129**, 999–1010 (2007).
87. Chakkalakal, J. V. *et al.* Early forming label-retaining muscle stem cells require p27kip1 for maintenance of the primitive state. *Development* **141**, 1649–1659 (2014).
88. Latil, M. *et al.* Skeletal muscle stem cells adopt a dormant cell state post mortem and retain regenerative capacity. *Nat. Commun.* **3**, 903 (2012).
89. Ryall, J. G. *et al.* The NAD(+)-dependent SIRT1 deacetylase translates a metabolic switch into regulatory epigenetics in skeletal muscle stem cells. *Cell Stem Cell* **16**, 171–183 (2015).
90. Fukada, S. *et al.* Molecular Signature of Quiescent Satellite Cells in Adult Skeletal Muscle. *Stem Cells* **25**, 2448–2459 (2007).
91. Shea, K. L. *et al.* Sprouty1 Regulates Reversible Quiescence of a Self-Renewing Adult Muscle Stem Cell Pool during Regeneration. *Cell Stem Cell* **6**, 117–129 (2010).
92. Fedorov, Y. V., Rosenthal, R. S. & Olwin, B. B. Oncogenic Ras-induced proliferation requires autocrine fibroblast growth factor 2 signaling in skeletal muscle cells. *J. Cell Biol.* **152**, 1301–1305 (2001).
93. Rocheteau, P., Gayraud-Morel, B., Siegl-Cachedenier, I., Blasco, M. A. & Tajbakhsh, S. A subpopulation of adult skeletal muscle stem cells retains all template DNA strands after cell division. *Cell* **148**, 112–125 (2012).
94. Fry, C. S. *et al.* Inducible depletion of satellite cells in adult, sedentary mice impairs muscle regenerative capacity without affecting sarcopenia. *Nat. Med.* **21**, 76–80 (2015).
95. Rodgers, J. T. *et al.* mTORC1 controls the adaptive transition of quiescent stem cells from G0 to G(Alert). *Nature* **510**, 393–396 (2014).
96. Rodgers, J. T., Schroeder, M. D., Ma, C. & Rando, T. A. HGFA Is an Injury-Regulated Systemic Factor that Induces the Transition of Stem Cells into GAlert. *Cell Rep.* **19**, 479–486 (2017).
97. Zammit, P. S. *et al.* Muscle satellite cells adopt divergent fates: a mechanism for self-renewal? *J. Cell Biol.* **166**, 347–357 (2004).
98. Morgan, J. *et al.* MMP-9 overexpression improves myogenic cell migration and engraftment. *Muscle Nerve* **42**, 584–595 (2010).
99. Öcalan, M., Goodman, S. L., Kühl, U., Hauschka, S. D. & von der Mark, K. Laminin alters cell shape and stimulates motility and proliferation of murine skeletal myoblasts. *Dev. Biol.* **125**, 158–167 (1988).
100. Siegel, A. L., Atchison, K., Fisher, K. E., Davis, G. E. & Cornelison, D. D. W. 3D timelapse analysis of muscle satellite cell motility. *Stem Cells Dayt. Ohio* **27**, 2527–2538 (2009).

101. Alfaro, L. A. S. *et al.* CD34 Promotes Satellite Cell Motility and Entry into Proliferation to Facilitate Efficient Skeletal Muscle Regeneration. *Stem Cells* **29**, 2030–2041 (2011).
102. Mylona, E., Jones, K. A., Mills, S. T. & Pavlath, G. K. CD44 regulates myoblast migration and differentiation. *J. Cell. Physiol.* **209**, 314–321 (2006).
103. Allen, R. E. & Boxhorn, L. K. Regulation of skeletal muscle satellite cell proliferation and differentiation by transforming growth factor-beta, insulin-like growth factor I, and fibroblast growth factor. *J. Cell. Physiol.* **138**, 311–315 (1989).
104. Allen, R. E., Sheehan, S. M., Taylor, R. G., Kendall, T. L. & Rice, G. M. Hepatocyte growth factor activates quiescent skeletal muscle satellite cells in vitro. *J. Cell. Physiol.* **165**, 307–312 (1995).
105. Tatsumi, R., Anderson, J. E., Nevoret, C. J., Halevy, O. & Allen, R. E. HGF/SF Is Present in Normal Adult Skeletal Muscle and Is Capable of Activating Satellite Cells. *Dev. Biol.* **194**, 114–128 (1998).
106. Liu, Y. & Schneider, M. F. FGF2 activates TRPC and Ca2+ signaling leading to satellite cell activation. *Front. Physiol.* **5**, (2014).
107. Cornelison, D. D. W. *et al.* Essential and separable roles for Syndecan-3 and Syndecan-4 in skeletal muscle development and regeneration. *Genes Dev.* **18**, 2231–2236 (2004).
108. Floss, T., Arnold, H.-H. & Braun, T. A role for FGF-6 in skeletal muscle regeneration. *Genes Dev.* **11**, 2040–2051 (1997).
109. Acharyya, S. *et al.* TNF Inhibits Notch-1 in Skeletal Muscle Cells by Ezh2 and DNA Methylation Mediated Repression: Implications in Duchenne Muscular Dystrophy. *PLoS ONE* **5**, e12479 (2010).
110. Yablonka-Reuveni, Z. & Rivera, A. J. Temporal expression of regulatory and structural muscle proteins during myogenesis of satellite cells on isolated adult rat fibers. *Dev. Biol.* **164**, 588–603 (1994).
111. Christov, C. *et al.* Muscle Satellite Cells and Endothelial Cells: Close Neighbors and Privileged Partners□D. *Mol. Biol. Cell* **18**, 13 (2007).
112. Halevy, O. *et al.* Correlation of Terminal Cell Cycle Arrest of Skeletal Muscle with Induction of p21 by MyoD. *Sci. New Ser.* **267**, 1018–1021 (1995).
113. Lluís, F., Ballestar, E., Suelves, M., Esteller, M. & Muñoz-Cánoves, P. E47 phosphorylation by p38 MAPK promotes MyoD/E47 association and muscle-specific gene transcription. *EMBO J.* **24**, 974–984 (2005).
114. Friday, B. B., Horsley, V. & Pavlath, G. K. Calcineurin Activity Is Required for the Initiation of Skeletal Muscle Differentiation. *J. Cell Biol.* **149**, 657–666 (2000).
115. Millay, D. P. *et al.* Myomaker is a membrane activator of myoblast fusion and muscle formation. *Nature* **499**, 301–305 (2013).
116. Bi, P. *et al.* Control of muscle formation by the fusogenic micropeptide myomixer. *Science* **356**, 323–327 (2017).
117. Segawa, M. *et al.* Suppression of macrophage functions impairs skeletal muscle regeneration with severe fibrosis. *Exp. Cell Res.* **314**, 3232–3244 (2008).
118. St Pierre, B. A. & Tidball, J. G. Differential response of macrophage subpopulations to soleus muscle reloading after rat hindlimb suspension. *J. Appl. Physiol.* **77**, 290–297 (1994).
119. Frenette, J., Cai, B. & Tidball, J. G. Complement Activation Promotes Muscle Inflammation during Modified Muscle Use. *Am. J. Pathol.* **156**, 2103–2110 (2000).
120. Gordon, J. R. & Galli, S. J. Mast cells as a source of both preformed and immunologically inducible TNF. a I cachectin. **346**, 3 (1990).
121. Brigitte, M. *et al.* Muscle resident macrophages control the immune cell reaction in a

mouse model of notexin-induced myoinjury. *Arthritis Rheum.* **62**, 268–279 (2010).
122. Fielding, R. A. *et al.* Acute phase response in exercise. III. Neutrophil and IL-1 beta accumulation in skeletal muscle. *Am. J. Physiol.-Regul. Integr. Comp. Physiol.* **265**, R166–R172 (1993).
123. Teixeira, C. F. P. *et al.* Neutrophils do not contribute to local tissue damage, but play a key role in skeletal muscle regeneration, in mice injected with *Bothrops asper* snake venom: Neutrophils and Venom-Induced Tissue Damage. *Muscle Nerve* **28**, 449–459 (2003).
124. Scapini, P. *et al.* The neutrophil as a cellular source of chemokines. *Immunol. Rev.* **177**, 195–203 (2000).
125. Cheng, M., Nguyen, M.-H., Fantuzzi, G. & Koh, T. J. Endogenous interferon-γ is required for efficient skeletal muscle regeneration. *Am. J. Physiol.-Cell Physiol.* **294**, C1183–C1191 (2008).
126. Fujishima, S. *et al.* Regulation of neutrophil interleukin 8 gene expression and protein secretion by LPS, TNF-?, and IL-1? *J. Cell. Physiol.* **154**, 478–485 (1993).
127. Arnold, L. *et al.* Inflammatory monocytes recruited after skeletal muscle injury switch into antiinflammatory macrophages to support myogenesis. *J. Exp. Med.* **204**, 1057–1069 (2007).
128. Geissmann, F., Jung, S. & Littman, D. R. Blood Monocytes Consist of Two Principal Subsets with Distinct Migratory Properties. *Immunity* **19**, 71–82 (2003).
129. Warren, G. L. *et al.* Chemokine receptor CCR2 involvement in skeletal muscle regeneration. *FASEB J.* **19**, 1–23 (2005).
130. Martinez, C. O. *et al.* Regulation of skeletal muscle regeneration by CCR2-activating chemokines is directly related to macrophage recruitment. *Am. J. Physiol.-Regul. Integr. Comp. Physiol.* **299**, R832–R842 (2010).
131. Lu, H., Huang, D., Ransohoff, R. M. & Zhou, L. Acute skeletal muscle injury: CCL2 expression by both monocytes and injured muscle is required for repair. *FASEB J.* **25**, 3344–3355 (2011).
132. Shireman, P. K. *et al.* MCP-1 deficiency causes altered inflammation with impaired skeletal muscle regeneration. *J. Leukoc. Biol.* **81**, 775–785 (2007).
133. Novak, M. L. *et al.* Macrophage-Specific Expression of Urokinase-Type Plasminogen Activator Promotes Skeletal Muscle Regeneration. *J. Immunol.* **187**, 1448–1457 (2011).
134. Zhang, L. *et al.* Chemokine CXCL16 Regulates Neutrophil and Macrophage Infiltration into Injured Muscle, Promoting Muscle Regeneration. *Am. J. Pathol.* **175**, 2518–2527 (2009).
135. Lehtonen, A., Matikainen, S. & Julkunen, I. Interferons up-regulate STAT1, STAT2, and IRF family transcription factor gene expression in human peripheral blood mononuclear cells and macrophages. 11.
136. Yoshioka, Y., Yamamuro, A. & Maeda, S. Nitric oxide at a low concentration protects murine macrophage RAW264 cells against nitric oxide-induced death *via* cGMP signaling pathway: Nitric oxide protects macrophages against apoptosis. *Br. J. Pharmacol.* **139**, 28–34 (2003).
137. Dumont, N., Bouchard, P. & Frenette, J. Neutrophil-induced skeletal muscle damage: a calculated and controlled response following hindlimb unloading and reloading. *Am. J. Physiol.-Regul. Integr. Comp. Physiol.* **295**, R1831–R1838 (2008).
138. Nguyen, H. X. & Tidball, J. G. Interactions between neutrophils and macrophages promote macrophage killing of rat muscle cells in vitro. *J. Physiol.* **547**, 125–132 (2003).
139. Wang, H. *et al.* Altered Macrophage Phenotype Transition Impairs Skeletal Muscle Regeneration. *Am. J. Pathol.* **184**, 1167–1184 (2014).
140. Fadok, V. A. *et al.* Macrophages That Have Ingested Apoptotic Cells In Vitro Inhibit Proinflammatory Cytokine Production Through Autocrine/Paracrine Mechanisms Involving

TGF-ᴺι, PGE2, and PAF. 9.
141. Fadok, V. A., Bratton, D. L., Guthrie, L. & Henson, P. M. Differential Effects of Apoptotic Versus Lysed Cells on Macrophage Production of Cytokines: Role of Proteases. *J. Immunol.* **166**, 6847–6854 (2001).
142. Tonkin, J. *et al.* Monocyte/Macrophage-derived IGF-1 Orchestrates Murine Skeletal Muscle Regeneration and Modulates Autocrine Polarization. *Mol. Ther.* **23**, 1189–1200 (2015).
143. Villalta, S. A. *et al.* Interleukin-10 reduces the pathology of mdx muscular dystrophy by deactivating M1 macrophages and modulating macrophage phenotype. *Hum. Mol. Genet.* **20**, 790–805 (2011).
144. Sulahian, T. H. *et al.* HUMAN MONOCYTES EXPRESS CD163, WHICH IS UPREGULATED BY IL-10 AND IDENTICAL TO p155. *Cytokine* **12**, 1312–1321 (2000).
145. Deng, B., Wehling-Henricks, M., Villalta, S. A., Wang, Y. & Tidball, J. G. IL-10 Triggers Changes in Macrophage Phenotype That Promote Muscle Growth and Regeneration. *J. Immunol.* **189**, 3669–3680 (2012).
146. Sag, D., Carling, D., Stout, R. D. & Suttles, J. AMP-activated protein kinase promotes macrophage polarization to an anti-inflammatory functional phenotype. 18 (2009).
147. Mounier, R. *et al.* AMPKα1 Regulates Macrophage Skewing at the Time of Resolution of Inflammation during Skeletal Muscle Regeneration. *Cell Metab.* **18**, 251–264 (2013).
148. Kristiansen, M., Graversen, J. H., Jacobsen, C., Sonne, O. & Moestrup, S. K. Identi®cation of the haemoglobin scavenger receptor. **409**, 4 (2001).
149. Schaer, D. J., Boretti, F. S., Schoedon, G. & Schaffner, A. Induction of the CD163-dependent haemoglobin uptake by macrophages as a novel anti-inflammatory action of glucocorticoids: *Short Report*. *Br. J. Haematol.* **119**, 239–243 (2002).
150. Merly, F., Lescaudron, L., Rouaud, T., Crossin, F. & Gardahaut, M. F. Macrophages enhance muscle satellite cell proliferation and delay their differentiation. *Muscle Nerve* **22**, 724–732 (1999).
151. Cantini, M. & Carraro, U. Macrophage-released factor stimulates selectively myogenic cells in primary muscle culture. *Journal of Neuropathology and experimental Neurology* 121–128 (1995).
152. Cantini, M. *et al.* Human satellite cell proliferation in vitro is regulated by autocrine secretion of IL-6 stimulated by a soluble factor(s) released by activated monocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* (1995).
153. Sonnet, C. *et al.* Human macrophages rescue myoblasts and myotubes from apoptosis through a set of adhesion molecular systems. *J. Cell Sci.* **119**, 2497–2507 (2006).
154. Saclier, M. *et al.* Differentially Activated Macrophages Orchestrate Myogenic Precursor Cell Fate During Human Skeletal Muscle Regeneration. *Stem Cells* **31**, 384–396 (2013).
155. Filippin, L. I. *et al.* Nitric oxide regulates the repair of injured skeletal muscle. *Nitric Oxide* **24**, 43–49 (2011).
156. Londhe, P. & Davie, J. K. Gamma Interferon Modulates Myogenesis through the Major Histocompatibility Complex Class II Transactivator, CIITA. *Mol. Cell. Biol.* **31**, 2854–2866 (2011).
157. Li, Y.-P. TNF-␣ is a mitogen in skeletal muscle. **285**, 7 (2003).
158. Langen, R. C. J., Wouters, E. F. M. & Janssen-Heininger, Y. M. W. Inflammatory cytokines inhibit myogenic differentiation through activation of nuclear factor-□B. *FASEB J.* 12.
159. Torrente, Y. *et al.* Tumor Necrosis Factor-α (TNF-α) Stimulates Chemotactic Response in Mouse Myogenic Cells. *Cell Transplant.* **12**, 91–100 (2003).

160. Hinz, M. *et al.* NF-□B Function in Growth Control: Regulation of Cyclin D1 Expression and G0/G1-to-S-Phase Transition. *MOL CELL BIOL* **19**, 9 (1999).
161. Chen, S.-E. *et al.* Role of TNF- signaling in regeneration of cardiotoxin-injured muscle. *Am. J. Physiol.-Cell Physiol.* **289**, (2005).
162. Girgenrath, M. *et al.* TWEAK, via its receptor Fn14, is a novel regulator of mesenchymal progenitor cells and skeletal muscle regeneration. *EMBO J.* **25**, 5826–5839 (2006).
163. Mittal, A. *et al.* Genetic Ablation of TWEAK Augments Regeneration and Post-Injury Growth of Skeletal Muscle in Mice. *Am. J. Pathol.* **177**, 1732–1742 (2010).
164. Gallucci, S. Myoblasts produce IL-6 in response to inflammatory stimuli. *Int. Immunol.* **10**, 267–273 (1998).
165. Serrano, A. L., Baeza-Raja, B., Perdiguero, E., Jardí, M. & Muñoz-Cánoves, P. Interleukin-6 Is an Essential Regulator of Satellite Cell-Mediated Skeletal Muscle Hypertrophy. *Cell Metab.* **7**, 33–44 (2008).
166. Zhang, C. *et al.* Interleukin-6/Signal Transducer and Activator of Transcription 3 (STAT3) Pathway Is Essential for Macrophage Infiltration and Myoblast Proliferation during Muscle Regeneration. *J. Biol. Chem.* **288**, 1489–1499 (2013).
167. Lu, H. *et al.* Macrophages recruited *via* CCR2 produce insulin-like growth factor-1 to repair acute skeletal muscle injury. *FASEB J.* **25**, 358–369 (2011).
168. Akahori, H. *et al.* CD163 interacts with TWEAK to regulate tissue regeneration after ischaemic injury. *Nat. Commun.* **6**, 7792 (2015).
169. Fukada, S. *et al.* Hesr1 and Hesr3 are essential to generate undifferentiated quiescent satellite cells and to maintain satellite cell numbers. *Development* **138**, 4609–4619 (2011).
170. Bjornson, C. R. R. *et al.* Notch Signaling Is Necessary to Maintain Quiescence in Adult Muscle Stem Cells. *Stem Cells* **30**, 232–242 (2012).
171. Mourikis, P. *et al.* A Critical Requirement for Notch Signaling in Maintenance of the Quiescent Skeletal Muscle Stem Cell State. *Stem Cells* **30**, 243–252 (2012).
172. Pisconti, A., Cornelison, D. D. W., Olguín, H. C., Antwine, T. L. & Olwin, B. B. Syndecan-3 and Notch cooperate in regulating adult myogenesis. *J. Cell Biol.* **190**, 427–441 (2010).
173. Conboy, I. M. & Rando, T. A. The Regulation of Notch Signaling Controls Satellite Cell Activation and Cell Fate Determination in Postnatal Myogenesis. *Dev. Cell* 13.
174. Wilson-Rawls, J., Molkentin, J. D., Black, B. L. & Olson, E. N. Activated Notch Inhibits Myogenic Activity of the MADS-Box Transcription Factor Myocyte Enhancer Factor 2C. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 2853–2862 (1999).
175. Brack, A. S., Conboy, I. M., Conboy, M. J., Shen, J. & Rando, T. A. A Temporal Switch from Notch to Wnt Signaling in Muscle Stem Cells Is Necessary for Normal Adult Myogenesis. *Cell Stem Cell* **2**, 50–59 (2008).
176. Kopan, R., Nye, J. S. & Weintraub, H. The intracellular domain of mouse Notch: a constitutively activated repressor of myogenesis directed at the basic helix-loop-helix region of MyoD. 12.
177. Le Grand, F., Jones, A. E., Seale, V., Scimè, A. & Rudnicki, M. A. Wnt7a Activates the Planar Cell Polarity Pathway to Drive the Symmetric Expansion of Satellite Stem Cells. *Cell Stem Cell* **4**, 535–547 (2009).
178. Bentzinger, C. F. *et al.* Fibronectin Regulates Wnt7a Signaling and Satellite Cell Expansion. *Cell Stem Cell* **12**, 75–87 (2013).
179. Bentzinger, C. F. *et al.* Wnt7a stimulates myogenic stem cell motility and engraftment resulting in improved muscle strength. *J. Cell Biol.* **205**, 97–111 (2014).
180. Otto, A. *et al.* Canonical Wnt signalling induces satellite-cell proliferation during adult skeletal muscle regeneration. *J. Cell Sci.* **121**, 2939–2950 (2008).

181. Parisi, A. *et al.* APC is required for muscle stem cell proliferation and skeletal muscle tissue repair. *J. Cell Biol.* **210**, 717–726 (2015).
182. Wu, Z. *et al.* p38 and Extracellular Signal-Regulated Kinases Regulate the Myogenic Program at Multiple Steps. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 3951–3964 (2000).
183. Rochat, A. *et al.* Insulin and Wnt1 Pathways Cooperate to Induce Reserve Cell Activation in Differentiation and Myotube Hypertrophy. *Mol. Biol. Cell* **15**, 4544–4555 (2004).
184. van der Velden, J. L. J. *et al.* Inhibition of glycogen synthase kinase-3β activity is sufficient to stimulate myogenic differentiation. *Am. J. Physiol.-Cell Physiol.* **290**, C453–C462 (2006).
185. Rudolf, A. *et al.* β-Catenin Activation in Muscle Progenitor Cells Regulates Tissue Repair. *Cell Rep.* **15**, 1277–1290 (2016).
186. Kim, C.-H., Neiswender, H., Baik, E. J., Xiong, W. C. & Mei, L. β-Catenin Interacts with MyoD and Regulates Its Transcription Activity. *Mol. Cell. Biol.* **28**, 2941–2951 (2008).
187. Ridgeway, A. G., Petropoulos, H., Wilton, S. & Skerjanc, I. S. Wnt Signaling Regulates the Function of MyoD and Myogenin. *J. Biol. Chem.* **275**, 32398–32405 (2000).
188. Beyer, S. *et al.* Canonical Wnt signalling regulates nuclear export of Setdb1 during skeletal muscle terminal differentiation. *Cell Discov.* **2**, 16037 (2016).
189. Brack, A. S. *et al.* BCL9 is an essential component of canonical Wnt signaling that mediates the differentiation of myogenic progenitors during muscle regeneration. *Dev. Biol.* **335**, 93–105 (2009).
190. Zetser, A., Gredinger, E. & Bengal, E. p38 Mitogen-activated Protein Kinase Pathway Promotes Skeletal Muscle Differentiation: PARTICIPATION OF THE MEF2C TRANSCRIPTION FACTOR. *J. Biol. Chem.* **274**, 5193–5200 (1999).
191. Jones, N. C. *et al.* The p38α/β MAPK functions as a molecular switch to activate the quiescent satellite cell. *J. Cell Biol.* **169**, 105–116 (2005).
192. Gillespie, M. A. *et al.* p38-γ–dependent gene silencing restricts entry into the myogenic differentiation program. *J. Cell Biol.* **187**, 991–1005 (2009).
193. Perdiguero, E., Ruiz-Bonilla, V., Serrano, A. L. & Muñoz-Cánoves, P. Genetic Deficiency of p38α Reveals its Critical Role in Myoblast Cell Cycle Exit:The p38α-JNK Connection. *Cell Cycle* **6**, 1298–1303 (2007).
194. Chen, S.-E., Jin, B. & Li, Y.-P. TNF-α regulates myogenesis and muscle regeneration by activating p38 MAPK. *Am. J. Physiol.-Cell Physiol.* **292**, C1660–C1671 (2007).
195. Clemente, C. F. M. Z., Corat, M. A. F., Saad, S. T. O. & Franchini, K. G. Differentiation of C $_2$ C $_{12}$ myoblasts is critically regulated by FAK signaling. *Am. J. Physiol.-Regul. Integr. Comp. Physiol.* **289**, R862–R870 (2005).
196. Sunadome, K. *et al.* ERK5 Regulates Muscle Cell Fusion through Klf Transcription Factors. *Dev. Cell* **20**, 192–205 (2011).
197. Alter, J., Rozentzweig, D. & Bengal, E. Inhibition of Myoblast Differentiation by Tumor Necrosis Factor α Is Mediated by c-Jun N-terminal Kinase 1 and Leukemia Inhibitory Factor. *J. Biol. Chem.* **283**, 23224–23234 (2008).
198. Sun, L. *et al.* JAK1–STAT1–STAT3, a key pathway promoting proliferation and preventing premature differentiation of myoblasts. *J. Cell Biol.* **179**, 129–138 (2007).
199. Tierney, M. T. *et al.* STAT3 signaling controls satellite cell expansion and skeletal muscle repair. *Nat. Med.* **20**, 1182–1186 (2014).
200. Bakkar, N. *et al.* IKK/NF-□B regulates skeletal myogenesis via a signaling switch to inhibit differentiation and promote mitochondrial biogenesis. 16.
201. Mourkioti, F. & Rosenthal, N. NF-κB signaling in skeletal muscle: prospects for intervention in muscle diseases. *J. Mol. Med.* **86**, 747–759 (2008).
202. Guttridge, D. C., Albanese, C., Reuther, J. Y., Pestell, R. G. & Baldwin, A. S. NF-□B

Controls Cell Growth and Differentiation through Transcriptional Regulation of Cyclin D. *MOL CELL BIOL* **19**, 15 (1999).
203. Langen, R. C. J. *et al.* Tumor necrosis factor-alpha inhibits myogenic differentiation through MyoD protein destabilization. *FASEB J.* **18**, 227–237 (2004).
204. Uezumi, A., Fukada, S., Yamamoto, N., Takeda, S. & Tsuchida, K. Mesenchymal progenitors distinct from satellite cells contribute to ectopic fat cell formation in skeletal muscle. *Nat. Cell Biol.* **12**, 143–152 (2010).
205. Joe, A. W. B. *et al.* Muscle injury activates resident fibro/adipogenic progenitors that facilitate myogenesis. *Nat. Cell Biol.* **12**, 153–163 (2010).
206. Eisner, C. *et al.* Murine Tissue-Resident PDGFRα+ Fibro-Adipogenic Progenitors Spontaneously Acquire Osteogenic Phenotype in an Altered Inflammatory Environment. *J. Bone Miner. Res.* **35**, 1525–1534 (2020).
207. Dupas, T. *et al.* Fetal muscle contains different CD34+ cell subsets that distinctly differentiate into adipogenic, angiogenic and myogenic lineages. *Stem Cell Res.* **7**, 230–243 (2011).
208. Goloviznina, N. A., Xie, N., Dandapat, A., Iaizzo, P. A. & Kyba, M. Prospective isolation of human fibroadipogenic progenitors with CD73. *Heliyon* **6**, e04503 (2020).
209. Arrighi, N. *et al.* Characterization of adipocytes derived from fibro/adipogenic progenitors resident in human skeletal muscle. *Cell Death Dis.* **6**, e1733–e1733 (2015).
210. Uezumi, A. *et al.* Identification and characterization of PDGFRα+ mesenchymal progenitors in human skeletal muscle. *Cell Death Dis.* **5**, e1186–e1186 (2014).
211. Wosczyna, M. N. *et al.* Mesenchymal Stromal Cells Are Required for Regeneration and Homeostatic Maintenance of Skeletal Muscle. *Cell Rep.* **27**, 2029-2035.e5 (2019).
212. Uezumi, A. *et al.* Mesenchymal Bmp3b expression maintains skeletal muscle integrity and decreases in age-related sarcopenia. *J. Clin. Invest.* **131**, e139617 (2021).
213. Chapman, M. A., Mukund, K., Subramaniam, S., Brenner, D. & Lieber, R. L. Three distinct cell populations express extracellular matrix proteins and increase in number during skeletal muscle fibrosis. *Am. J. Physiol.-Cell Physiol.* **312**, C131–C143 (2017).
214. Nwadozi, E. *et al.* Leptin is a physiological regulator of skeletal muscle angiogenesis and is locally produced by PDGFRα and PDGFRβ expressing perivascular cells. *Angiogenesis* **22**, 103–115 (2019).
215. Heredia, J. E. *et al.* Type 2 Innate Signals Stimulate Fibro/Adipogenic Progenitors to Facilitate Muscle Regeneration. *Cell* **153**, 376–388 (2013).
216. Santini, M. P. *et al.* Tissue-Resident PDGFRα+ Progenitor Cells Contribute to Fibrosis versus Healing in a Context- and Spatiotemporally Dependent Manner. *Cell Rep.* **30**, 555-570.e7 (2020).
217. Saito, Y., Chikenji, T. S., Matsumura, T., Nakano, M. & Fujimiya, M. Exercise enhances skeletal muscle regeneration by promoting senescence in fibro-adipogenic progenitors. *Nat. Commun.* **11**, 889 (2020).
218. Lemos, D. R. *et al.* Nilotinib reduces muscle fibrosis in chronic muscle injury by promoting TNF-mediated apoptosis of fibro/adipogenic progenitors. *Nat. Med.* **21**, 786–794 (2015).
219. Kuswanto, W. *et al.* Poor Repair of Skeletal Muscle in Aging Mice Reflects a Defect in Local, Interleukin-33-Dependent Accumulation of Regulatory T Cells. *Immunity* **44**, 355–367 (2016).
220. Dong, Y., Silva, K. A. S., Dong, Y. & Zhang, L. Glucocorticoids increase adipocytes in muscle by affecting IL-4 regulated FAP activity. *FASEB J.* **28**, 4123–4132 (2014).
221. Davies, M. R. *et al.* TGF-β Small Molecule Inhibitor SB431542 Reduces Rotator Cuff Muscle Fibrosis and Fatty Infiltration By Promoting Fibro/Adipogenic Progenitor Apoptosis. *PLOS ONE* **11**, e0155486 (2016).

222. Contreras, O. *et al.* The cross-talk between TGF-β and PDGFRα signaling pathways regulates stromal fibro/adipogenic progenitors' fate. *J. Cell Sci.* jcs.232157 (2019) doi:10.1242/jcs.232157.
223. Dong, J., Dong, Y., Chen, Z., Mitch, W. E. & Zhang, L. The pathway to muscle fibrosis depends on myostatin stimulating the differentiation of fibro/adipogenic progenitor cells in chronic kidney disease. *Kidney Int.* **91**, 119–128 (2017).
224. Fiore, D. *et al.* Pharmacological blockage of fibro/adipogenic progenitor expansion and suppression of regenerative fibrogenesis is associated with impaired skeletal muscle regeneration. *Stem Cell Res.* **17**, 161–169 (2016).
225. Madaro, L. *et al.* Denervation-activated STAT3–IL-6 signalling in fibro-adipogenic progenitors promotes myofibres atrophy and fibrosis. *Nat. Cell Biol.* **20**, 917–927 (2018).
226. Lukjanenko, L. *et al.* Aging Disrupts Muscle Stem Cell Function by Impairing Matricellular WISP1 Secretion from Fibro-Adipogenic Progenitors. *Cell Stem Cell* **24**, 433-446.e7 (2019).
227. Reggio, A. *et al.* Adipogenesis of skeletal muscle fibro/adipogenic progenitors is affected by the WNT5a/GSK3/β-catenin axis. *Cell Death Differ.* **27**, 2921–2941 (2020).
228. Moratal, C., Arrighi, N., Dechesne, C. A. & Dani, C. Control of Muscle Fibro-Adipogenic Progenitors by Myogenic Lineage is Altered in Aging and Duchenne Muscular Dystrophy. *Cell. Physiol. Biochem.* **53**, 1029–1045 (2019).
229. Kang, X. *et al.* Interleukin-15 facilitates muscle regeneration through modulation of fibro/adipogenic progenitors. *Cell Commun. Signal.* **16**, 42 (2018).
230. Vumbaca, S. *et al.* Characterization of the Skeletal Muscle Secretome Reveals a Role for Extracellular Vesicles and IL1α/IL1β in Restricting Fibro/Adipogenic Progenitor Adipogenesis. *Biomolecules* **11**, 1171 (2021).
231. Abe, R., Donnelly, S. C., Peng, T., Bucala, R. & Metz, C. N. Peripheral blood fibrocytes: differentiation pathway and migration to wound sites. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **166**, 7556–7562 (2001).
232. Kim, K. K. *et al.* Alveolar epithelial cell mesenchymal transition develops in vivo during pulmonary fibrosis and is regulated by the extracellular matrix. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 13180–13185 (2006).
233. Alexakis, C., Partridge, T. & Bou-Gharios, G. Implication of the satellite cell in dystrophic muscle fibrosis: a self-perpetuating mechanism of collagen overproduction. *Am. J. Physiol.-Cell Physiol.* **293**, C661–C669 (2007).
234. Bellayr, I., Holden, K., Mu, X., Pan, H. & Li, Y. Matrix metalloproteinase inhibition negatively affects muscle stem cell behavior. 18.
235. Zhang, Q. *et al.* Circulating mitochondrial DAMPs cause inflammatory responses to injury. *Nature* **464**, 104–107 (2010).
236. Vidal, B. *et al.* Fibrinogen drives dystrophic muscle fibrosis via a TGFβ/alternative macrophage activation pathway. *Genes Dev.* **22**, 1747–1752 (2008).
237. Murphy, M. M., Lawson, J. A., Mathew, S. J., Hutcheson, D. A. & Kardon, G. Satellite cells, connective tissue fibroblasts and their interactions are crucial for muscle regeneration. *Development* **138**, 3625–3637 (2011).
238. Osses, N. & Brandan, E. ECM is required for skeletal muscle differentiation independently of muscle regulatory factor expression. *Am. J. Physiol.-Cell Physiol.* **282**, C383–C394 (2002).
239. Urciuolo, A. *et al.* Collagen VI regulates satellite cell self-renewal and muscle regeneration. *Nat. Commun.* **4**, 1964 (2013).
240. Wang, W., Pan, H., Murray, K., Jefferson, B. S. & Li, Y. Matrix Metalloproteinase-1 Promotes Muscle Cell Migration and Differentiation. *Am. J. Pathol.* **174**, 541–549 (2009).
241. El Fahime, E., Torrente, Y., Caron, N. J., Bresolin, M. D. & Tremblay, J. P. In Vivo

Migration of Transplanted Myoblasts Requires Matrix Metalloproteinase Activity. *Exp. Cell Res.* **258**, 279–287 (2000).
242. Lei, H., Leong, D., Smith, L. R. & Barton, E. R. Matrix metalloproteinase 13 is a new contributor to skeletal muscle regeneration and critical for myoblast migration. *Am. J. Physiol.-Cell Physiol.* **305**, C529–C538 (2013).
243. Nishimura, T. *et al.* Inhibition of matrix metalloproteinases suppresses the migration of skeletal muscle cells. *J. Muscle Res. Cell Motil.* **29**, 37–44 (2008).
244. Ohtake, Y., Tojo, H. & Seiki, M. Multifunctional roles of MT1-MMP in myofiber formation and morphostatic maintenance of skeletal muscle. *J. Cell Sci.* **119**, 3822–3832 (2006).
245. Miyazaki, D. *et al.* Matrix metalloproteinase-2 ablation in dystrophin-deficient mdx muscles reduces angiogenesis resulting in impaired growth of regenerated muscle fibers. *Hum. Mol. Genet.* **20**, 1787–1799 (2011).
246. Bobadilla, M. *et al.* MMP-10 Is Required for Efficient Muscle Regeneration in Mouse Models of Injury and Muscular Dystrophy. *Stem Cells* **32**, 447–461 (2014).
247. Imai, K., Hiramatsu, A., Fukushima, D., Pierschbacher, M. D. & Okada, Y. Degradation of decorin by matrix metalloproteinases: identification of the cleavage sites, kinetic analyses and transforming growth factor- β 1 release. *Biochem. J.* **322**, 809–814 (1997).
248. Ignotz, R. A. & Massagué, J. Transforming growth factor-beta stimulates the expression of fibronectin and collagen and their incorporation into the extracellular matrix. *J. Biol. Chem.* **261**, 4337–4345 (1986).
249. Cencetti, F., Bernacchioni, C., Nincheri, P., Donati, C. & Bruni, P. Transforming Growth Factor-␣1 Induces Transdifferentiation of Myoblasts into Myofibroblasts via Up-Regulation of Sphingosine Kinase-1/S1P3 Axis. *Mol. Biol. Cell* **21**, 14 (2010).
250. Li, Y. *et al.* Transforming Growth Factor-␣1 Induces the Differentiation of Myogenic Cells into Fibrotic Cells in Injured Skeletal Muscle. **164**, 13 (2004).
251. Dong, Y. *et al.* Interactions between p-Akt and Smad3 in injured muscles initiate myogenesis or fibrogenesis. *Am. J. Physiol.-Endocrinol. Metab.* **305**, E367–E375 (2013).
252. Morales, M. G. *et al.* Reducing CTGF/CCN2 slows down mdx muscle dystrophy and improves cell therapy. *Hum. Mol. Genet.* **22**, 4938–4951 (2013).
253. Morales, M. G. *et al.* Inhibition of the angiotensin-converting enzyme decreases skeletal muscle fibrosis in dystrophic mice by a diminution in the expression and activity of connective tissue growth factor (CTGF/CCN-2). *Cell Tissue Res.* **353**, 173–187 (2013).
254. Snow, MikelH. The effects of aging on satellite cells in skeletal muscles of mice and rats. *Cell Tissue Res.* **185**, (1977).
255. Kadi, F., Charifi, N., Denis, C. & Lexell, J. Satellite cells and myonuclei in young and elderly women and men. *Muscle Nerve* **29**, 120–127 (2004).
256. Shefer, G., Van de Mark, D. P., Richardson, J. B. & Yablonka-Reuveni, Z. Satellite-cell pool size does matter: defining the myogenic potency of aging skeletal muscle. *Dev. Biol.* **294**, 50–66 (2006).
257. Day, K., Shefer, G., Shearer, A. & Yablonka-Reuveni, Z. The depletion of skeletal muscle satellite cells with age is concomitant with reduced capacity of single progenitors to produce reserve progeny. *Dev. Biol.* **340**, 330–343 (2010).
258. Jejurikar, S. S. *et al.* Aging increases the susceptibility of skeletal muscle derived satellite cells to apoptosis. *Exp. Gerontol.* **41**, 828–836 (2006).
259. Brooks, N. E., Schuenke, M. D. & Hikida, R. S. No change in skeletal muscle satellite cells in young and aging rat soleus muscle. *J. Physiol. Sci.* **59**, 465–471 (2009).
260. Roth, S. M. *et al.* Skeletal muscle satellite cell populations in healthy young and older men and women. *Anat. Rec.* **260**, 351–358 (2000).

261. Chakkalakal, J. V., Jones, K. M., Basson, M. A. & Brack, A. S. The aged niche disrupts muscle stem cell quiescence. 19 (2013).
262. Sousa-Victor, P. *et al.* Geriatric muscle stem cells switch reversible quiescence into senescence. *Nature* **506**, 316–321 (2014).
263. Cosgrove, B. D. *et al.* Rejuvenation of the muscle stem cell population restores strength to injured aged muscles. *Nat. Med.* **20**, 255–264 (2014).
264. Bernet, J. D. *et al.* p38 MAPK signaling underlies a cell-autonomous loss of stem cell self-renewal in skeletal muscle of aged mice. *Nat. Med.* **20**, 265–271 (2014).
265. Lees, S. J., Rathbone, C. R. & Booth, F. W. Age-associated decrease in muscle precursor cell differentiation. *Am. J. Physiol.-Cell Physiol.* **290**, C609–C615 (2006).
266. Marsh, D. R., Criswell, D. S., Carson, J. A. & Booth, F. W. Myogenic regulatory factors during regeneration of skeletal muscle in young, adult, and old rats. *J. Appl. Physiol.* **83**, 1270–1275 (1997).
267. Dedkov, E. I., Kostrominova, T. Y., Borisov, A. B. & Carlson, B. M. MyoD and myogenin protein expression in skeletal muscles of senile rats. *Cell Tissue Res.* **311**, 401–416 (2003).
268. Blanc, R. S. *et al.* Inhibition of inflammatory CCR2 signaling promotes aged muscle regeneration and strength recovery after injury. *Nat. Commun.* **11**, 4167 (2020).
269. Conboy, I. M. *et al.* Rejuvenation of aged progenitor cells by exposure to a young systemic environment. *Nature* **433**, 760–764 (2005).
270. The role of hormones, cytokines and heat shock proteins during age-related muscle loss - PubMed. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17590243/.
271. Langen, R. C. J. *et al.* Muscle wasting and impaired muscle regeneration in a murine model of chronic pulmonary inflammation. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **35**, 689–696 (2006).
272. Brack, A. S. *et al.* Increased Wnt Signaling During Aging Alters Muscle Stem Cell Fate and Increases Fibrosis. *Science* **317**, 807–810 (2007).
273. Scimè, A. *et al.* Transcriptional profiling of skeletal muscle reveals factors that are necessary to maintain satellite cell integrity during ageing. *Mech. Ageing Dev.* **131**, 9–20 (2010).
274. Biressi, S., Miyabara, E. H., Gopinath, S. D., M. Carlig, P. M. & Rando, T. A. A Wnt-TGFβ2 axis induces a fibrogenic program in muscle stem cells from dystrophic mice. *Sci. Transl. Med.* **6**, (2014).
275. Conboy, I. M. Notch-Mediated Restoration of Regenerative Potential to Aged Muscle. *Science* **302**, 1575–1577 (2003).
276. Carlson, M. E., Hsu, M. & Conboy, I. M. Imbalance between pSmad3 and Notch induces CDK inhibitors in old muscle stem cells. *Nature* **454**, 528–532 (2008).
277. Carlson, M. E. *et al.* Molecular aging and rejuvenation of human muscle stem cells. *EMBO Mol. Med.* **1**, 381–391 (2009).
278. Price, F. D. *et al.* Inhibition of JAK-STAT signaling stimulates adult satellite cell function. *Nat. Med.* **20**, 1174–1181 (2014).
279. Sorensen, J. R. *et al.* An altered response in macrophage phenotype following damage in aged human skeletal muscle: implications for skeletal muscle repair. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **33**, 10353–10368 (2019).
280. Reidy, P. T. *et al.* Aging impairs mouse skeletal muscle macrophage polarization and muscle-specific abundance during recovery from disuse. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **317**, E85–E98 (2019).
281. Sloboda, D. D., Brown, L. A. & Brooks, S. V. Myeloid Cell Responses to Contraction-induced Injury Differ in Muscles of Young and Old Mice. *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* **73**, 1581–1590 (2018).

282. Cui, C.-Y. *et al.* Skewed macrophage polarization in aging skeletal muscle. *Aging Cell* **18**, e13032 (2019).
283. Chelvarajan, R. L., Collins, S. M., Van Willigen, J. M. & Bondada, S. The unresponsiveness of aged mice to polysaccharide antigens is a result of a defect in macrophage function. *J. Leukoc. Biol.* **77**, 503–512 (2005).
284. Wang, Y. *et al.* Aging of the immune system causes reductions in muscle stem cell populations, promotes their shift to a fibrogenic phenotype, and modulates sarcopenia. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **33**, 1415–1427 (2019).
285. Varga, T. *et al.* Macrophage PPARγ, a Lipid Activated Transcription Factor Controls the Growth Factor GDF3 and Skeletal Muscle Regeneration. *Immunity* **45**, 1038–1051 (2016).
286. Patsalos, A. *et al.* In vivo GDF3 administration abrogates aging related muscle regeneration delay following acute sterile injury. *Aging Cell* **17**, e12815 (2018).
287. Hirata, A. *et al.* Expression profiling of cytokines and related genes in regenerating skeletal muscle after cardiotoxin injection: a role for osteopontin. *Am. J. Pathol.* **163**, 203–215 (2003).
288. Uaesoontrachoon, K. *et al.* Osteopontin and skeletal muscle myoblasts: association with muscle regeneration and regulation of myoblast function in vitro. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **40**, 2303–2314 (2008).
289. Paliwal, P., Pishesha, N., Wijaya, D. & Conboy, I. M. Age dependent increase in the levels of osteopontin inhibits skeletal muscle regeneration. *Aging* **4**, 553–566 (2012).
290. Sahu, A. *et al.* Age-related declines in α-Klotho drive progenitor cell mitochondrial dysfunction and impaired muscle regeneration. *Nat. Commun.* **9**, 4859 (2018).
291. Ahrens, H. E., Huettemeister, J., Schmidt, M., Kaether, C. & von Maltzahn, J. Klotho expression is a prerequisite for proper muscle stem cell function and regeneration of skeletal muscle. *Skelet. Muscle* **8**, 20 (2018).
292. Berria, R. *et al.* Increased collagen content in insulin-resistant skeletal muscle. *Am. J. Physiol.-Endocrinol. Metab.* **290**, E560–E565 (2006).
293. Williams, P. E. & Goldspink, G. Connective tissue changes in immobilised muscle. 8.
294. Haus, J. M., Carrithers, J. A., Trappe, S. W. & Trappe, T. A. Collagen, cross-linking, and advanced glycation end products in aging human skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.* **103**, 2068–2076 (2007).
295. Hidestrand, M. *et al.* Sca-1-Expressing Nonmyogenic Cells Contribute to Fibrosis in Aged Skeletal Muscle. *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* **63**, 566–579 (2008).
296. Cappola, A. R., Bandeen-Roche, K., Wand, G. S., Volpato, S. & Fried, L. P. Association of IGF-I levels with muscle strength and mobility in older women. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **86**, 4139–4146 (2001).
297. Beggs, M. L. *et al.* Alterations in the TGFβ signaling pathway in myogenic progenitors with age: Alterations in the TGFβ signaling pathway, M. L. Beggs et al. *Aging Cell* **3**, 353–361 (2004).
298. Adams, G. R. & McCue, S. A. Localized infusion of IGF-I results in skeletal muscle hypertrophy in rats. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md 1985* **84**, 1716–1722 (1998).
299. Musarò, A. *et al.* Localized Igf-1 transgene expression sustains hypertrophy and regeneration in senescent skeletal muscle. *Nat. Genet.* **27**, 195–200 (2001).
300. Iranmanesh, A., Lizarralde, G. & Veldhuis, J. D. Age and relative adiposity are specific negative determinants of the frequency and amplitude of growth hormone (GH) secretory bursts and the half-life of endogenous GH in healthy men. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **73**, 1081–1088 (1991).
301. Léger, B., Derave, W., De Bock, K., Hespel, P. & Russell, A. P. Human sarcopenia reveals an increase in SOCS-3 and myostatin and a reduced efficiency of Akt phosphorylation. *Rejuvenation Res.* **11**, 163-175B (2008).

302. Welle, S., Bhatt, K., Shah, B. & Thornton, C. Insulin-like growth factor-1 and myostatin mRNA expression in muscle: comparison between 62-77 and 21-31 yr old men. *Exp. Gerontol.* **37**, 833–839 (2002).
303. McPherron, A. C., Lawler, A. M. & Lee, S. J. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member. *Nature* **387**, 83–90 (1997).
304. Trendelenburg, A. U. *et al.* Myostatin reduces Akt/TORC1/p70S6K signaling, inhibiting myoblast differentiation and myotube size. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **296**, C1258-1270 (2009).
305. Bergen, H. R. *et al.* Myostatin as a mediator of sarcopenia versus homeostatic regulator of muscle mass: insights using a new mass spectrometry-based assay. *Skelet. Muscle* **5**, 21 (2015).
306. Sinha-Hikim, I., Cornford, M., Gaytan, H., Lee, M. L. & Bhasin, S. Effects of testosterone supplementation on skeletal muscle fiber hypertrophy and satellite cells in community-dwelling older men. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **91**, 3024–3033 (2006).
307. Sinha-Hikim, I., Roth, S. M., Lee, M. I. & Bhasin, S. Testosterone-induced muscle hypertrophy is associated with an increase in satellite cell number in healthy, young men. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **285**, E197-205 (2003).
308. Singh, R. *et al.* Regulation of myogenic differentiation by androgens: cross talk between androgen receptor/ beta-catenin and follistatin/transforming growth factor-beta signaling pathways. *Endocrinology* **150**, 1259–1268 (2009).
309. Braga, M., Bhasin, S., Jasuja, R., Pervin, S. & Singh, R. Testosterone inhibits transforming growth factor-β signaling during myogenic differentiation and proliferation of mouse satellite cells: potential role of follistatin in mediating testosterone action. *Mol. Cell. Endocrinol.* **350**, 39–52 (2012).
310. Kovacheva, E. L., Hikim, A. P. S., Shen, R., Sinha, I. & Sinha-Hikim, I. Testosterone supplementation reverses sarcopenia in aging through regulation of myostatin, c-Jun NH2-terminal kinase, Notch, and Akt signaling pathways. *Endocrinology* **151**, 628–638 (2010).
311. Ferrando, A. A. *et al.* Testosterone administration to older men improves muscle function: molecular and physiological mechanisms. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **282**, E601-607 (2002).
312. Ferrando, A. A. *et al.* Testosterone injection stimulates net protein synthesis but not tissue amino acid transport. *Am. J. Physiol.* **275**, E864-871 (1998).
313. White, J. P. *et al.* Testosterone regulation of Akt/mTORC1/FoxO3a signaling in skeletal muscle. *Mol. Cell. Endocrinol.* **365**, 174–186 (2013).
314. Urban, R. J. *et al.* Testosterone administration to elderly men increases skeletal muscle strength and protein synthesis. *Am. J. Physiol.* **269**, E820-826 (1995).
315. Feldman, H. A. *et al.* Age trends in the level of serum testosterone and other hormones in middle-aged men: longitudinal results from the Massachusetts male aging study. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **87**, 589–598 (2002).
316. Hardin, B. J. *et al.* TNF-alpha acts via TNFR1 and muscle-derived oxidants to depress myofibrillar force in murine skeletal muscle. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md 1985* **104**, 694–699 (2008).
317. Roubenoff, R. *et al.* Monocyte cytokine production in an elderly population: effect of age and inflammation. *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* **53**, M20-26 (1998).
318. Ferrucci, L. *et al.* Serum IL-6 level and the development of disability in older persons. *J. Am. Geriatr. Soc.* **47**, 639–646 (1999).
319. Ferrucci, L. *et al.* Change in muscle strength explains accelerated decline of physical function in older women with high interleukin-6 serum levels. *J. Am. Geriatr. Soc.* **50**, 1947–1954 (2002).
320. Tsujinaka, T. *et al.* Interleukin 6 receptor antibody inhibits muscle atrophy and

modulates proteolytic systems in interleukin 6 transgenic mice. *J. Clin. Invest.* **97**, 244–249 (1996).
321. Lazarus, D. D., Moldawer, L. L. & Lowry, S. F. Insulin-like growth factor-1 activity is inhibited by interleukin-1 alpha, tumor necrosis factor-alpha, and interleukin-6. *Lymphokine Cytokine Res.* **12**, 219–223 (1993).
322. Tazawa, R. *et al.* Elevated leptin levels induce inflammation through IL-6 in skeletal muscle of aged female rats. *BMC Musculoskelet. Disord.* **20**, 199 (2019).
323. Henneicke, H. *et al.* Skeletal glucocorticoid signalling determines leptin resistance and obesity in aging mice. *Mol. Metab.* **42**, 101098 (2020).
324. Vella, C. A., Cushman, M., Van Hollebeke, R. B. & Allison, M. A. Associations of Abdominal Muscle Area and Radiodensity with Adiponectin and Leptin: The Multiethnic Study of Atherosclerosis. *Obes. Silver Spring Md* **26**, 1234–1241 (2018).
325. Lana, A., Valdés-Bécares, A., Buño, A., Rodríguez-Artalejo, F. & Lopez-Garcia, E. Serum Leptin Concentration is Associated with Incident Frailty in Older Adults. *Aging Dis.* **8**, 240–249 (2017).
326. Can, B. *et al.* Serum markers of inflammation and oxidative stress in sarcopenia. *Aging Clin. Exp. Res.* **29**, 745–752 (2017).
327. Baker, J. F. *et al.* The Adiponectin Paradox in the Elderly: Associations With Body Composition, Physical Functioning, and Mortality. *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* **74**, 247–253 (2019).
328. Rossi, F. E. *et al.* Influence of skeletal muscle mass and fat mass on the metabolic and inflammatory profile in sarcopenic and non-sarcopenic overfat elderly. *Aging Clin. Exp. Res.* **31**, 629–635 (2019).
329. Wu, D. *et al.* Aging Up-Regulates Expression of Inflammatory Mediators in Mouse Adipose Tissue. *J. Immunol.* **179**, 4829–4839 (2007).
330. Yousif, A. S. & Elagib, A. A. Haptoglobin Phenotypes and Susceptibility to Schistosoma Parasites Infection in Central Sudan. *Mediterr. J. Hematol. Infect. Dis.* (2021).
331. Zhou, J. *et al.* Haptoglobin 2-2 Genotype is Associated with More Advanced Disease in Subjects with Non-Alcoholic Steatohepatitis: A Retrospective Study. *Adv. Ther.* **36**, 880–895 (2019).
332. Elagib, A. A., Kider, A. O., Akerström, B. & Elbashir, M. I. Association of the haptoglobin phenotype (1-1) with falciparum malaria in Sudan. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **92**, 309–311 (1998).
333. Kushner, I., Gewurz, H. & Benson, M. D. C-reactive protein and the acute-phase response. *J. Lab. Clin. Med.* **97**, 739–749 (1981).
334. Oller do Nascimento, C., Hunter, L. & Trayhurn, P. Regulation of haptoglobin gene expression in 3T3-L1 adipocytes by cytokines, catecholamines, and PPARγ. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **313**, 702–708 (2004).
335. Fain, J. N., Bahouth, S. W. & Madan, A. K. Haptoglobin release by human adipose tissue in primary culture. *J. Lipid Res.* **45**, 536–542 (2004).
336. Maffei, M. *et al.* The obesity and inflammatory marker haptoglobin attracts monocytes via interaction with chemokine (C-C motif) receptor 2 (CCR2). *BMC Biol.* **7**, 87 (2009).
337. Wang, Y., Kinzie, E., Berger, F. G., Lim, S.-K. & Baumann, H. Haptoglobin, an inflammation-inducible plasma protein. *Redox Rep.* **6**, 379–385 (2001).
338. Castell, J. V. *et al.* Recombinant human interleukin-6 (IL-6/BSF-2/HSF) regulates the synthesis of acute phase proteins in human hepatocytes. *FEBS Lett.* **232**, 347–350 (1988).
339. Raynes, J. G., Eagling, S. & McAdam, K. P. Acute-phase protein synthesis in human hepatoma cells: differential regulation of serum amyloid A (SAA) and haptoglobin by interleukin-1 and interleukin-6. *Clin. Exp. Immunol.* **83**, 488–491 (1991).
340. Wang, Y., Kinzie, E., Berger, F. G., Lim, S.-K. & Baumann, H. Haptoglobin, an

inflammation-inducible plasma protein. *Redox Rep.* **6**, 379–385 (2001).
341. Theilgaard-Monch, K. Haptoglobin is synthesized during granulocyte differentiation, stored in specific granules, and released by neutrophils in response to activation. *Blood* **108**, 353–361 (2006).
342. Yang, H. *et al.* Identification of CD163 as an antiinflammatory receptor for HMGB1-haptoglobin complexes. *JCI Insight* **1**, (2016).
343. Krzyszczyk, P. *et al.* Anti-inflammatory effects of haptoglobin on LPS -stimulated macrophages: Role of HMGB1 signaling and implications in chronic wound healing. *Wound Repair Regen.* **28**, 493–505 (2020).
344. Etzerodt, A. *et al.* Plasma Clearance of Hemoglobin and Haptoglobin in Mice and Effect of CD163 Gene Targeting Disruption. *Antioxid. Redox Signal.* **18**, 2254–2263 (2013).
345. Nielsen, M. J. *et al.* A Unique Loop Extension in the Serine Protease Domain of Haptoglobin Is Essential for CD163 Recognition of the Haptoglobin-Hemoglobin Complex. *J. Biol. Chem.* **282**, 1072–1079 (2007).
346. Fagoonee, S. *et al.* Plasma Protein Haptoglobin Modulates Renal Iron Loading. *Am. J. Pathol.* **166**, 973–983 (2005).
347. Lim, S.-K. *et al.* Increased Susceptibility in Hp Knockout Mice During Acute Hemolysis. *Blood* **92**, 1870–1877 (1998).
348. Buehler, P. W. *et al.* Haptoglobin preserves the CD163 hemoglobin scavenger pathway by shielding hemoglobin from peroxidative modification. *Blood* **113**, 2578–2586 (2009).
349. Chiellini, C. *et al.* Obesity modulates the expression of haptoglobin in the white adipose tissue via TNFα: OBESITY INDUCES WAT HAPTOGLOBIN VIA TNFα. *J. Cell. Physiol.* **190**, 251–258 (2002).
350. Vázquez-Moreno, M. *et al.* Causal Association of Haptoglobin With Obesity in Mexican Children: A Mendelian Randomization Study. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **105**, e2501–e2510 (2020).
351. Lisi, S. *et al.* Obesity-Associated Hepatosteatosis and Impairment of Glucose Homeostasis Are Attenuated by Haptoglobin Deficiency. *Diabetes* **60**, 2496–2505 (2011).
352. Gamucci, O. *et al.* Haptoglobin deficiency determines changes in adipocyte size and adipogenesis. *Adipocyte* **1**, 142–183 (2012).
353. Bueno, A. A. *et al.* Long chain saturated fatty acids increase haptoglobin gene expression in C57BL/6J mice adipose tissue and 3T3-L1 cells. *Eur. J. Nutr.* **49**, 235–241 (2010).
354. Vernochet, C., Davis, K. E., Scherer, P. E. & Farmer, S. R. Mechanisms Regulating Repression of Haptoglobin Production by Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-γ Ligands in Adipocytes. *Endocrinology* **151**, 586–594 (2010).
355. Epelbaun, R. *et al.* Haptoglobin-related protein as a serum marker in malignant lymphoma. *Pathology Oncology research* (1998).
356. Dunzendorfer, U., Jung, K. & Ohlenschlëager, G. Transfer- rin, C3 complement, haptoglobin, plasminogen and alpha 2-microglobulin in patients with urogenital tumors.
357. Garibay-Cerdenares, O., Hernández-Ramírez, V., Osorio-Trujillo, J., Gallardo-Rincón, D. & Talamás-Rohana, P. Haptoglobin and CCR2 receptor expression in ovarian cancer cells that were exposed to ascitic fluid: Exploring a new role of haptoglobin in the tumoral microenvironment. *Cell Adhes. Migr.* **9**, 394–405 (2015).
358. Bertaggia, E. *et al.* Haptoglobin Is Required to Prevent Oxidative Stress and Muscle Atrophy. *PLoS ONE* **9**, e100745 (2014).
359. Ding, J. & Kopchick, J. J. Plasma biomarkers of mouse aging. *Age Dordr. Neth.* **33**, 291–307 (2011).
360. Chiellini, C. *et al.* Serum Haptoglobin: A Novel Marker of Adiposity in Humans. *J.*

Clin. Endocrinol. Metab. **89**, 2678–2683 (2004).
361. Song, I.-U., Kim, Y.-D., Chung, S.-W. & Cho, H.-J. Association between serum haptoglobin and the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Intern. Med. Tokyo Jpn.* **54**, 453–457 (2015).
362. Spagnuolo, M. S. *et al.* Haptoglobin increases with age in rat hippocampus and modulates Apolipoprotein E mediated cholesterol trafficking in neuroblastoma cell lines. *Front. Cell. Neurosci.* **8**, 212 (2014).
363. Kredel, S. *et al.* High-content analysis of CCR2 antagonists on human primary monocytes. *J. Biomol. Screen.* **16**, 683–693 (2011).
364. Leng, S. X., Xue, Q.-L., Tian, J., Walston, J. D. & Fried, L. P. Inflammation and frailty in older women. *J. Am. Geriatr. Soc.* **55**, 864–871 (2007).
365. Hubbard, R. E., O'Mahony, M. S., Savva, G. M., Calver, B. L. & Woodhouse, K. W. Inflammation and frailty measures in older people. *J. Cell. Mol. Med.* **13**, 3103–3109 (2009).
366. Soysal, P. *et al.* Inflammation and frailty in the elderly: A systematic review and meta-analysis. *Ageing Res. Rev.* **31**, 1–8 (2016).
367. Wu, I.-C., Lin, X.-Z., Liu, P.-F., Tsai, W.-L. & Shiesh, S.-C. Low serum testosterone and frailty in older men and women. *Maturitas* **67**, 348–352 (2010).
368. Vogt, S. *et al.* Prospective association of vitamin D with frailty status and all-cause mortality in older adults: Results from the KORA-Age Study. *Prev. Med.* **73**, 40–46 (2015).
369. Hirani, V. *et al.* Associations between frailty and serum 25-hydroxyvitamin D and 1,25-dihydroxyvitamin D concentrations in older Australian men: the Concord Health and Ageing in Men Project. *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* **68**, 1112–1121 (2013).
370. Leng, S., Chaves, P., Koenig, K. & Walston, J. Serum interleukin-6 and hemoglobin as physiological correlates in the geriatric syndrome of frailty: a pilot study. *J. Am. Geriatr. Soc.* **50**, 1268–1271 (2002).
371. Inglés, M. *et al.* Oxidative stress is related to frailty, not to age or sex, in a geriatric population: lipid and protein oxidation as biomarkers of frailty. *J. Am. Geriatr. Soc.* **62**, 1324–1328 (2014).
372. Saum, K.-U. *et al.* Association between Oxidative Stress and Frailty in an Elderly German Population: Results from the ESTHER Cohort Study. *Gerontology* **61**, 407–415 (2015).
373. Tchkonia, T. *et al.* Fat tissue, aging, and cellular senescence: Fat tissue and aging. *Aging Cell* **9**, 667–684 (2010).
374. Minamino, T. *et al.* A crucial role for adipose tissue p53 in the regulation of insulin resistance. *Nat. Med.* **15**, 1082–1087 (2009).
375. Sawaki, D. *et al.* Visceral Adipose Tissue Drives Cardiac Aging Through Modulation of Fibroblast Senescence by Osteopontin Production. *Circulation* **138**, 809–822 (2018).
376. Shin, J. A. *et al.* Visceral adipose tissue inflammation is associated with age-related brain changes and ischemic brain damage in aged mice. *Brain. Behav. Immun.* **50**, 221–231 (2015).
377. Nyberg, C. K., Fjell, A. M. & Walhovd, K. B. Level of body fat relates to memory decline and interacts with age in its association with hippocampal and subcortical atrophy. *Neurobiol. Aging* **91**, 112–124 (2020).
378. Rossi, A. P. *et al.* Effects of body composition and adipose tissue distribution on respiratory function in elderly men and women: the health, aging, and body composition study. *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* **66**, 801–808 (2011).
379. Sastourné-Arrey, Q. *et al.* Adipose tissue is a source of regenerative cells that augment the repair of skeletal muscle after injury. *Nat. Commun.* **14**, 80 (2023).
380. Hickson, L. J. *et al.* Senolytics decrease senescent cells in humans: Preliminary report from a clinical trial of Dasatinib plus Quercetin in individuals with diabetic kidney disease.

EBioMedicine **47**, 446–456 (2019).
381. Xu, M. *et al.* Senolytics improve physical function and increase lifespan in old age. *Nat. Med.* **24**, 1246–1256 (2018).
382. Kulkarni, A. S. *et al.* Metformin regulates metabolic and nonmetabolic pathways in skeletal muscle and subcutaneous adipose tissues of older adults. *Aging Cell* **17**, e12723 (2018).
383. Martin, C. K. *et al.* Effect of Calorie Restriction on Mood, Quality of Life, Sleep, and Sexual Function in Healthy Nonobese Adults: The CALERIE 2 Randomized Clinical Trial. *JAMA Intern. Med.* **176**, 743–752 (2016).
384. Linford, N. J. *et al.* Transcriptional response to aging and caloric restriction in heart and adipose tissue. *Aging Cell* **6**, 673–688 (2007).
385. Wang, J. *et al.* Deletion of Nrip1 Extends Female Mice Longevity, Increases Autophagy, and Delays Cell Senescence. *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* **73**, 882–892 (2018).
386. Ghosh, A. K., O'Brien, M., Mau, T. & Yung, R. Toll-like receptor 4 (TLR4) deficient mice are protected from adipose tissue inflammation in aging. *Aging* **9**, 1971–1982 (2017).
387. Hahn, O. *et al.* A nutritional memory effect counteracts benefits of dietary restriction in old mice. *Nat. Metab.* **1**, 1059–1073 (2019).
388. Park, H. S., Park, J. Y. & Yu, R. Relationship of obesity and visceral adiposity with serum concentrations of CRP, TNF-alpha and IL-6. *Diabetes Res. Clin. Pract.* **69**, 29–35 (2005).
389. Gregor, M. F. & Hotamisligil, G. S. Inflammatory Mechanisms in Obesity. *Annu. Rev. Immunol.* **29**, 415–445 (2011).
390. Schrager, M. A. *et al.* Sarcopenic obesity and inflammation in the InCHIANTI study. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md 1985* **102**, 919–925 (2007).
391. Conley, K. E., Jubrias, S. A. & Esselman, P. C. Oxidative capacity and ageing in human muscle. *J. Physiol.* **526 Pt 1**, 203–210 (2000).
392. Visser, M. *et al.* Muscle mass, muscle strength, and muscle fat infiltration as predictors of incident mobility limitations in well-functioning older persons. *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* **60**, 324–333 (2005).
393. Hu, Z. *et al.* PTEN inhibition improves muscle regeneration in mice fed a high-fat diet. *Diabetes* **59**, 1312–1320 (2010).
394. Ahn, B. *et al.* Mitochondrial oxidative stress impairs contractile function but paradoxically increases muscle mass via fibre branching. *J. Cachexia Sarcopenia Muscle* **10**, 411–428 (2019).
395. Woo, M. *et al.* Early life nutrition modulates muscle stem cell number: implications for muscle mass and repair. *Stem Cells Dev.* **20**, 1763–1769 (2011).
396. Nguyen, M.-H., Cheng, M. & Koh, T. J. Impaired muscle regeneration in ob/ob and db/db mice. *ScientificWorldJournal* **11**, 1525–1535 (2011).
397. Sánchez Alvarado, A. Regeneration in the metazoans: why does it happen? *BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.* **22**, 578–590 (2000).
398. Timchenko, N. A. Aging and liver regeneration. *Trends Endocrinol. Metab. TEM* **20**, 171–176 (2009).
399. Wright, M. C. *et al.* Gliotoxin stimulates the apoptosis of human and rat hepatic stellate cells and enhances the resolution of liver fibrosis in rats. *Gastroenterology* **121**, 685–698 (2001).
400. Jiao, J. *et al.* Dendritic cell regulation of carbon tetrachloride-induced murine liver fibrosis regression. *Hepatol. Baltim. Md* **55**, 244–255 (2012).
401. Radaeva, S. *et al.* Natural killer cells ameliorate liver fibrosis by killing activated stellate cells in NKG2D-dependent and tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing

ligand-dependent manners. *Gastroenterology* **130**, 435–452 (2006).
402. Yaden, B. C. *et al.* Follistatin: a novel therapeutic for the improvement of muscle regeneration. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **349**, 355–371 (2014).
403. Fukushima, K. *et al.* The use of an antifibrosis agent to improve muscle recovery after laceration. *Am. J. Sports Med.* **29**, 394–402 (2001).