

Université
de Toulouse

THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Université Toulouse 3 Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier)

Présentée et soutenue par :

Claire Vinel

Le lundi 23 novembre 2015

Titre :

Rôle et régulation de l'apeline au cours
du vieillissement musculaire

ED BSB : Pharmacologie

Unité de recherche :

Institut des Maladies Métaboliques et Cardiovasculaires (I2MC)

Directeur(s) de Thèse :

Pr Philippe Valet & Dr Cédric Dray

Rapporteurs :

Dr Gillian Butler-Browne, Dr Béatrice Morio et Dr Hugo Aguilaniu

Autre(s) membre(s) du jury :

Pr Bruno Vellas

RESUME

Le vieillissement de la population est un phénomène universel dont l'amélioration des conditions de vie est la principale cause. Cependant, dans 20% des cas, l'avancée en âge s'accompagne aussi d'une perte de l'autonomie qui nécessite une prise en charge institutionnelle lourde pour le patient et la société. Une des principales causes de cette transition fragilité/dépendance réside dans la diminution dramatique de la masse et de la fonction musculaire, aussi appelée sarcopénie. Dans ce contexte, il devient primordial de mieux caractériser cette pathologie afin de mettre au point de nouvelles stratégies thérapeutiques. Dans cette optique, nous nous sommes intéressés à l'apeline, un peptide endogène circulant, dont le rôle favorable sur le métabolisme énergétique du muscle squelettique a été mis en évidence au sein du laboratoire dans un contexte d'obésité. **A partir de ces précédents résultats nous avons donc émis l'hypothèse d'un rôle bénéfique de l'apeline sur la physiologie du tissu musculaire au cours du vieillissement.**

Dans un premier temps, nous avons démontré que la contraction du muscle strié squelettique *in vitro* et *in vivo* chez la souris et l'homme, génère une production et une sécrétion musculaire d'apeline. Cette régulation par l'exercice physique est apparue altérée chez les souris âgées, et ceci s'accompagne d'une diminution des taux d'apeline plasmatiques chez la souris, comme chez l'individu âgé. De plus, nous avons pu démontrer, chez l'homme âgé pratiquant un exercice chronique, l'existence d'une corrélation entre les capacités d'augmentation de l'apelinémie et l'efficacité de l'exercice en termes de force physique.

Parallèlement, nous avons pu mettre en évidence une augmentation significative de la masse et de la fonction musculaire de souris âgées suite à une supplémentation (pharmacologique ou génique) chronique en apeline. Ces effets s'expliquent en partie par l'activation du métabolisme énergétique des fibres musculaires, nécessitant l'activation de l'axe AMPK-PGC1 α qui permet une potentialisation de la biogénèse mitochondriale. D'autre part, des expériences de régénération musculaire démontrent que l'apeline est également capable d'activer les cellules satellites, cellules souches résidentes du muscle squelettique.

Au cœur de différentes approches (prédictive, préventive et thérapeutique), l'apeline s'inscrit dans un nouvel axe de recherche quant à la détection (biomarqueur) et la prise en charge (traitement pharmacologique) des faiblesses musculaires associées au vieillissement.

ABSTRACT

Population aging is universal phenomenon explained mostly by improvement of living condition. However, in 20% of cases, aging is associated with loss of autonomy needing high intensity care for both patients and society. Dramatic loss of skeletal muscle mass and function, called sarcopenia, is the main cause of transition from frailty to dependency. It becomes essential to precisely characterize this pathology in order to develop new therapeutic strategy. In this context, we focused on apelin, a circulating endogenous peptide, which has been described in our lab as energetic metabolism booster of obese mice skeletal muscle. **From this previous work, we made the hypothesis that apelin could have a beneficial role on skeletal muscle physiology during aging.**

First, we put out, *in vitro* and *in vivo*, that mice and human muscle contraction lead to muscle apelin production and secretion. This regulation appeared blunt in aged mice, combined with decrease of plasma apelin in aged mice and elderly. Furthermore, in old patient, there is a positive correlation between rising plasma apelin ability and success of training on improvement of skeletal muscle function.

Beside, pharmacologic or gene chronic apelin supplementation leads to significative gain of skeletal muscle mass and function in old mice. Explanation takes place in improvement of energetic metabolism of muscle fibers through mitochondrial biogenesis in an AMPK-PGC1 α dependant pathway.

In another hand, muscle regeneration experiments showed activation of satellite cells, skeletal muscle resident stem cells, by apelin supplementation.

Apelin appeared to be in the crossroad of distinct approaches (predictive, preventive and therapeutic) in future research angle as biomarker and pharmacological treatment of age-induced skeletal muscle weakness.

SOMMAIRE

Partie I

Comment définir la sarcopénie en pratique clinique ?

A] Des mots sur les maux.....	6
B] Techniques d'exploration du muscle squelettique chez l'homme	7
1/ Mesure de la masse musculaire	7
2/ Mesure de la force musculaire.....	10
3/ Mesure de la performance physique.....	12
C] Diagnostique et prévalence de la sarcopénie chez des individus âgés	13

Partie II

Quels sont les facteurs responsables de la sarcopénie ?

I- MECANISMES INTRINSEQUES FAVORISANT LA SARCOPENIE	16
A] Altération de la balance protéique	16
1/ Synthèse protéique	17
2/ Dégradation protéique ou protéolyse.....	19
3/ Régulation de la balance protéique au cours du vieillissement	23
B] Dysfonctions mitochondriales.....	28
1/ Les mitochondries du muscle squelettique	28
2/ Les altérations mitochondriales au cours du vieillissement.....	36
3/ Conséquences des altérations mitochondriales sur la cellule musculaire au cours du vieillissement.....	37
4/ Les régulations impliquées dans les dysfonctions mitochondriales au cours du vieillissement.	42
C] Modification de la répartition des fibres musculaires	45
1/ Les différents types de fibres.....	45
2/ Répartitions des fibres au sein d'un muscle et influence du vieillissement.....	46
D] Diminution du renouvellement cellulaire.....	47
1/ Apoptose	47
2/ Sénescence	49
3/ Régénération cellulaire.....	50
II- MECANISMES EXTRINSEQUES FAVORISANT LA SARCOPENIE	54
A] Innervation	54

B] Modification des facteurs circulants au cours du vieillissement	56
1/ Les facteurs de croissance et de différenciation	56
2/ Les androgènes	58
3/ Vitamine D.....	60
4/ Inflammation.....	61
III- LES MODELS EXPERIMENTAUX DE LA SARCOPENIE.....	64
A] Les souris	64
1/ Souris sauvages.....	64
2/ Souris IL10-/-.....	64
3/ Souris SAMP	64
4/ Souris BUBR1	65
5/ Souris Werner	66
B] Les rats.....	66
1/ Les rats Sauvages.....	66
2/ Souche de Rats OXYS.....	67
C] Les modèles non rongeurs.....	67
1/ La Drosophile	67
2/ Caenorhabditis elegans.....	68
3/ Le poisson Africain killifish.....	68

Partie III

Quels sont les traitements d'aujourd'hui et de demain contre la sarcopénie ?

A] Interventions comportementales	69
1/ Exercice physique	69
2/ Nutrition.....	74
B] Interventions médicales	81
1) Thérapie cellulaire.....	81
2) Les approches pharmacologiques pour lutter contre la sarcopénie	82

Partie IV

Le couple APELINE/APJ

A] Découverte et structure	87
1/ APJ	87
2/ Apeline	88
B] Localisations et régulation du complexe Apeline/APJ.....	89
1/ Localisations	89
2/ Voies de signalisation intra cellulaires activées par APJ.....	90
3/ Régulation	91
D] Rôles	94
1/ Cardiovasculaires.....	94
2/ Angiogénèse	96
3/ Système Nerveux Central (SNC).....	96
4/ Métabolisme.....	98

Partie V

Travaux de these

Role et régulation de l'apeline dans le vieillissement musculaire

A] Régulation de l'apeline dans la physiologie musculaire au cours du temps de la cellule à l'homme.	107
B] Rôle de l'apeline dans le vieillissement musculaire	113
C] Rôle et régulation de l'apeline dans la régénération musculaire au cours du vieillissement.	127
D] L'apeline : biomarqueur du succès d'un exercice chez la personne âgée ?	131

Rôle et régulation de l'apeline au cours de troubles cognitifs post-opératoires

A] Un traitement à l'apeline permet-il de prévenir les TCPO chez des souris jeunes et âgées ?	145
B] L'apeline centrale et périphérique est-elle régulée au cours d'une opération chirurgicale sous anesthésie et des TCPO ?	151

CONCLUSIONS	
PERSPECTIVES	165

ANNEXES

BIBLIOGRAPHIE

INTRODUCTION GENERALE

PARTIE I

Comment définir la sarcopénie en pratique clinique ?

A] Des mots sur les maux.

Etymologiquement, la sarcopénie renvoie à une perte de la masse musculaire (*penia*, la perte, *sarx* la chair). Cet événement a été décrit pour la première fois dans les années 30 par Critchley qui l'a attribué à une diminution du nombre de fibres musculaires [1]. Depuis, de nombreuses études ont complété cette définition en intégrant les concepts de perte progressive de la masse et de la fonction musculaire au cours de l'âge [2]. A partir de ces constatations, la définition de la sarcopénie a évolué et il a fallu attendre 2010 pour qu'un consensus européen sur la définition de la sarcopénie soit établie par l'EWGSOP (*European Working Group on Sarcopenia in Older People*). Cette approche permet de classer les patients selon la gravité de l'atteinte musculaire qu'ils présentent. Ainsi, on qualifie de **présarcopéniques** les patients présentant une diminution isolée de la masse musculaire, de **sarcopéniques**, des individus affectés par une perte de masse, de force ou de performance musculaire, puis enfin, de **sarcopéniques sévères**, les patients cumulant les trois paramètres [3]. L'EWGSOP propose également que la sarcopénie soit reconnue comme un **syndrome gériatrique** [4], ce qui faciliterait son identification et son traitement, même si les causes sont encore mal connues [5]. En 2011, un consensus international conduit par John Morley et l'IWGS (*International Working Group on Sarcopenia*) est adopté par la communauté scientifique et clinique. Il définit la sarcopénie par **une diminution de la masse musculaire associée à des troubles de la mobilité**. Ces deux paramètres se caractérisant par une vitesse de marche inférieure à 1 mètre par seconde ou par un parcours de 400 mètres réalisé en plus de 6 minutes. Il faut noter que cette définition se base uniquement sur la masse et les performances musculaires sans

Le **syndrome gériatrique** est une situation de santé définie par 4 critères : 1) sa fréquence augmente fortement avec l'âge ou est réservée uniquement aux personnes âgées, 2) il résulte de facteurs multiples et divers chroniques ou aigus, 3) il a pour conséquences fréquentes le risque de perte de l'indépendance ou l'entrée en institution, et 4) il requiert une prise en charge multi-composante, globale et holistique du patient. Parmi les syndromes gériatriques connus on retrouve le risque de chutes, le delirium ou la dénutrition par exemple.

tenir compte de la force musculaire [6]. Enfin, plus récemment, une étude menée sur 26 625 participants a conduit le FNIIH (*Foundation for the National Institutes of Health Sarcopenia Project*) à souligner l'importance de la composition corporelle sur le diagnostic de la sarcopénie et à proposer une définition de cette pathologie comportant de nouveaux seuils de sélection des patients tenant compte de la composition corporelle [7].

B] Techniques d'exploration du muscle squelettique chez l'homme

Afin de mieux appréhender les différentes définitions de la sarcopénie et leurs évolutions, il est nécessaire de bien maîtriser les techniques d'évaluation permettant d'explorer la physiologie musculaire.

1/ Mesure de la masse musculaire

- **Les techniques d'imageries**

Il existe 3 techniques d'imagerie médicale qui sont actuellement utilisées en recherche et en clinique.

La **Tomodensitométrie** (CT, en anglais pour *Computed Tomography*) et l'**imagerie par résonance magnétique** (IRM) sont des techniques extrêmement précises quant à l'évaluation de la masse musculaire d'un individu. La CT permet de reconstruire le volume d'un objet à partir d'une série de mesures effectuées par tranche depuis l'extérieur de cet objet. L'IRM est basée sur la résonance magnétique nucléaire (RMN) qui nécessite un champ magnétique, c'est une technique non invasive et qui ne nécessite pas l'irradiation du sujet contrairement à la CT. Cependant, le coût de ces deux techniques et les expositions aux radiations qu'elles imposent aux patients les rendent utilisables dans un contexte exceptionnel de recherche mais inexploitable pour une utilisation clinique quotidienne.

La **technique d'absorption bi-photonique à rayon X** (DEXA pour Dual Energy X-Ray Absorptiometry) est basée sur l'absorption des rayons, dépendante de la quantité et de la qualité de la matière qu'ils traversent. Cette technique permet la distinction des masses maigre, grasse et osseuse à coût et exposition réduits. Le DEXA est une

solution largement adoptée pour la recherche et la clinique, même si le volume de l'appareil et l'expertise nécessaires à son fonctionnement limitent de nombreux sites à son accessibilité, réduisant de fait son utilisation à des études épidémiologiques à large échelle.

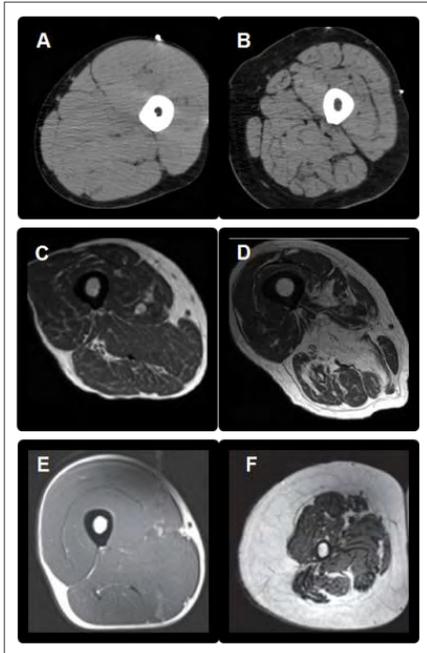


Figure 1: Différents types d'imageries d'une coupe transversale de cuisse de sujets jeunes (A, C et E) et d'un sujet âgé (B, D et F).

Imageries réalisées par CT (A et B), IRM (C et D) et DEXA (E et F) de membres inférieurs de sujets jeunes (A, C et E) et âgés de plus de 70 ans (B, D et F)

- **La Bioimpédancemétrie (BIA pour *BioImpedence Analysis*)**

La BIA est une alternative à ces techniques d'imagerie. Elle permet d'évaluer la masse maigre et grasse grâce à leurs propriétés différentielles de conductivité. Cette technique est peu coûteuse, non-invasive et facilement transportable pour une utilisation hospitalière comme ambulatoire [8]. Cette technique est très reproductible et corrèle avec les résultats obtenus par IRM [9].

- **Mesure du Potassium**

Le muscle squelettique contient plus de 50% du potassium corporel total (TBK pour *Total Body Potassium*) et son évaluation, par spectroscopie, permet d'estimer la masse musculaire [10]. Récemment, l'équipe de Wang a montré que la mesure du potassium au niveau des bras (PKB pour *Partial potassium Body*) permettrait une estimation de la masse musculaire proche des prédictions obtenues par des techniques d'imageries telles que le CT, l'IRM ou le DEXA [11].

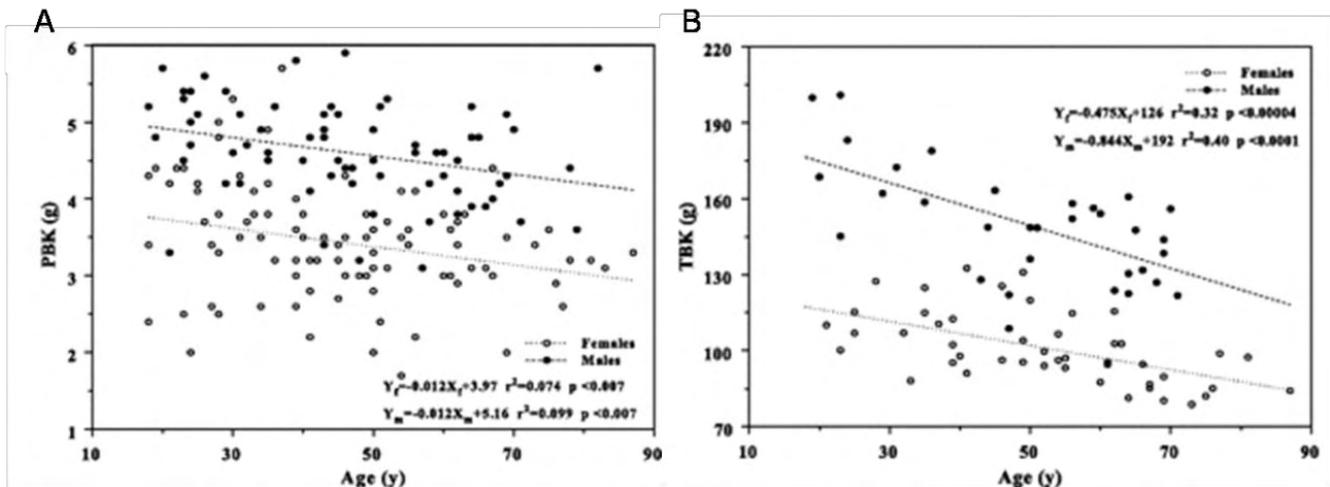


Figure 2: Masse Potassique en fonction de l'âge chez les hommes et les femmes [11].

Les femmes sont représentées par les ronds vides et les hommes, par les ronds pleins. Masse Potassique Partielle mesurée au niveau des bras (PKB) (A) et Masse Potassique Totale (PKT) (B) en grammes en fonction de l'âge.

- **L'anthropométrie**

Il s'agit d'une technique empirique qui mesure le rapport entre l'épaisseur de la peau et la circonférence du bras. Avec l'âge, les modifications de composition des dépôts adipeux et la perte d'élasticité de la peau faussent les valeurs, rendant peu fiable cette technique.

Il n'y a actuellement aucune méthode de routine utilisée en clinique pour mesurer la masse musculaire totale d'un individu. Cependant, des équipes scientifiques sont en constante recherche de nouveaux moyens techniques, non invasifs et peu coûteux pour palier ce manque. Ces dernières années, la dernière approche mise au point et celle de la **d3-créatinine**, qui semble prometteuse.

- **Créatinine-d3**

98% de la créatine totale est présente dans le muscle squelettique. Elle est métabolisée en créatinine par une cyclisation hydrolytique non enzymatique irréversible. La créatinine est ensuite rapidement transportée dans le plasma puis éliminée dans les urines comme illustré par la **figure 3**. Les quantités de créatinine retrouvées dans les urines sont donc liées à sa production dans le muscle qui elle-même est directement

proportionnelle à la quantité de créatine totale et à la masse musculaire.

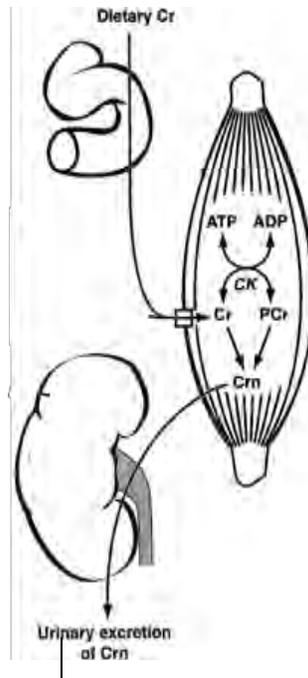


Figure 3: Métabolisme de la créatine [12]

Le muscle stocke la grande majorité de la créatine mais n'ayant la capacité de la synthétiser, il la puise dans le sang où elle est sécrétée par le rein et le foie et apportée par l'alimentation. Dans le muscle squelettique, la créatine et phosphocréatine sont converties en créatinine de façon non enzymatique, qui est ensuite excrétée par le rein dans les urines.

Cette méthode, récemment validée chez le rat, est basée sur l'ingestion par voie orale d'une dose connue de créatine marquée par un isotope radioactif (méthyl-d₃). Le produit métabolisé, la créatinine-d₃, est mesuré dans les urines 48h après ingestion. Les résultats retrouvés ont été validés par comparaison avec ceux obtenus par DEXA et IRM. Cette méthode a été récemment (juin 2014) validée chez l'homme avec un dosage de la créatinine-d₃ urinaire par spectrométrie de masse (LC-MS/MS) [13], [14].

2/ Mesure de la force musculaire

Il existe plusieurs techniques pour mesurer la force d'un individu. Bien que celle des membres inférieurs, nécessaire à la locomotion, soit plus pertinente pour diagnostiquer la sarcopénie, c'est souvent la force des membres supérieurs qui est la plus utilisée en clinique. Il est important de noter que lors des mesures de fonctions musculaires de personnes âgées, les tests peuvent être biaisés par des paramètres non musculaires comme la motivation ou les capacités cognitives.

- **Grip test**

La mesure de la force isométrique de main (*handgrip*) est un bon marqueur clinique de la mobilité et le meilleur indice prédictif de la masse musculaire [3]. La force de préhension est mesurée à l'aide d'un dynamomètre comme montré dans la **figure 4**. C'est une mesure simple et efficace d'évaluation de la force musculaire [15].

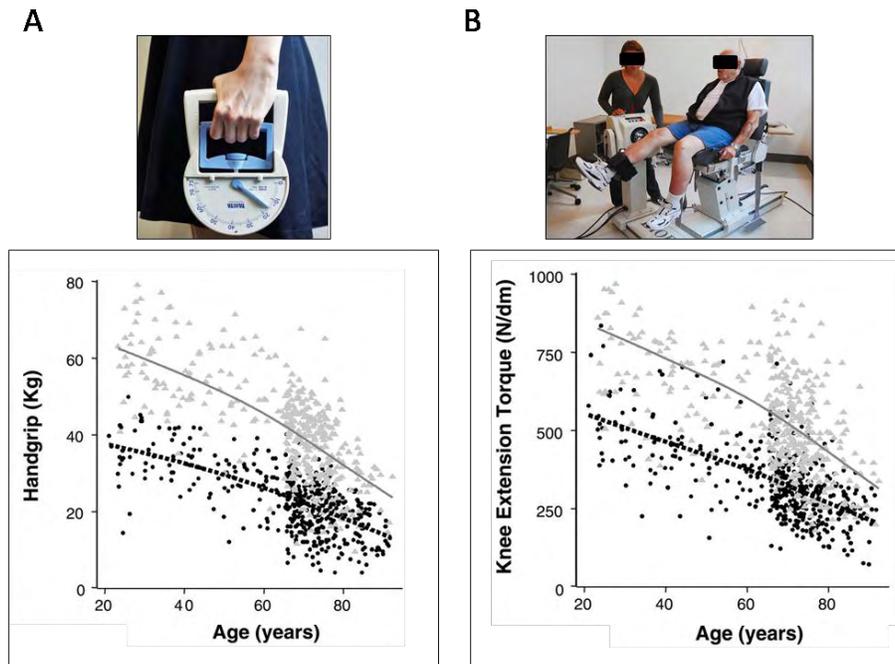


Figure 4 : Mesure de la force de préhension (Hand grip) et de la force d'extension du genou [15].

Les femmes sont représentées par des points noirs et les hommes par des triangles gris sur les graphiques. **A.** Illustration du dynamomètre servant à mesurer la force de préhension chez les personnes âgées. Evolution de la force de préhension (en kg) selon l'âge et le sexe. (D'après Lauretani et al, 2003). **B.** Illustration de l'équipement servant à mesurer la force de flexion/extension du genou. Evolution de la force d'extension du genou (en N/dm) selon l'âge et le sexe.

- **Flexion/extension du genou**

La force isométrique maximale volontaire peut être mesurée facilement avec un appareillage adéquat. Le sujet est assis, les genoux en flexion, puis la cheville est maintenue et la force maximale développée afin d'étendre la jambe est enregistrée. Il s'agit de la force isométrique, définie par une contraction musculaire n'entraînant pas de modification de la taille des fibres musculaires (détaillé plus loin). Cette mesure est utilisée en recherche mais l'utilisation courante en clinique est limitée par la nécessité d'équipements spécifiques.

- **SPPB (Short Physical Performance Battery)**

Le SPPB évalue 4 paramètres que sont l'**équilibre**, la **marche**, la **force** et l'**endurance**. Il est composé de différents tests dont la vitesse de marche ou la vitesse de levée de chaise qui sont indépendamment utilisés pour évaluer la sarcopénie en recherche. L'addition des scores obtenus aux différents tests permet d'évaluer l'état de santé physique des individus âgés sur 12. **La sarcopénie est diagnostiquée pour un SPPB ≤ 8** [16]. C'est une mesure standard très utilisée aussi bien en recherche qu'en clinique.

- **Vitesse de marche**

Ce test de marche est compris dans le SPPB. Une vitesse de marche faible ($< 1\text{m/sec}$) est un indice prédictif de la survenue d'évènements délétères sur la santé [17]. Selon l'EWGSOP, **une vitesse de marche inférieure à 0.8 mètres par seconde est considérée comme prédictif de la sarcopénie** [18].

- **Get-up and go test**

Le sujet doit être apte à faire différents mouvements comme se lever d'une chaise, marcher sur une petite distance (3 mètres), faire demi-tour et retourner s'asseoir. Les différentes fonctions sont évaluées et notées permettant de donner un indice d'équilibre dynamique sur 5 [19]. D'après une étude de Bruyère et ses collaborateurs publiée en 2015 et réalisée sur plus de 500 sujets âgés, le test « up and go » est un bon prédicteur du risque de chute. En effet, les sujets sarcopéniques réalisaient le test en 14,8 sec (± 7.62), tandis que les sujets non sarcopéniques le faisaient en 11.1 (± 4.87) [20].

- **Test de puissance de montée des marches**

Le temps nécessaire pour monter 10 marches d'un escalier permet d'évaluer la puissance des membres inférieurs (puissance= force x vitesse). La vitesse et la force sont calculées en fonction de la taille des marches, de la masse corporelle de l'individu et de l'accélération due à la gravité. Les résultats obtenus avec cette technique ont été comparables à ceux obtenus avec d'autres mesures de la performance physique comme la vitesse de marche et le lever de chaise chez 138 sujets d'une moyenne de d'âge de 75 ans [21].

C] Diagnostique et prévalence de la sarcopénie chez des individus âgés.

Comme nous l'avons évoqué plus haut, il n'existe à ce jour pas de définition exacte et consensuelle de la sarcopénie. Dès lors, comme le montre le **tableau 1**, la prévalence de la maladie dépend de la définition utilisée.

CRITERE	DEFINITION			PREVALENCE	
	Performances physiques	Force musculaire	ALM (masse maigre appendiculaire)	Homme n=7113	Femme n=2950
NIH	Vitesse de marche ≤ 0.8m/s	Hand-grip Homme < 26 kg Femme < 16 kg	ALM/BMI Homme < 0.789 Femme < 0.512	0.5	1.8
IWG	Vitesse de marche < 10m/s		ALM/Taille² Homme ≤ 7.23 kg/m ² Femme ≤ 5.67 kg/m ²	5.1	11.8
EWGSOP	Vitesse de marche < 0.8 m/s	Hand-grip Homme < 30kg Femme < 20 kg	ALM/Taille² Homme ≤ 7.23 kg/m ² Femme ≤ 5.67 kg/m ²	5.3	13.3
AWGS	Vitesse de marche < 0.8 m/s	Hand-grip Homme < 26kg Femme < 18 kg	ALM/Taille² Homme ≤ 7.0 kg/m ² Femme ≤ 5.4 kg/m ²	6.4	11.5

Tableau 1: Diagnostique et prévalence de la sarcopénie selon sa définition [22]

Pour le NIH, IWG et EWGSOP, les sujets de cohortes existantes ont été sélectionnés *a posteriori* selon leur âge (>65 ans). Les seuils de l'Asian Working Group for Sarcopenia (AWGS) sont établis [23] et la prévalence d'après [24] sur une population de 1069 Chinois âgés de plus de 60 ans. BMI= *Body Mass Index*. ALM= *Appendicular Lean Mass*.

Comme le montre l'étude de Studenski [22], les prévalences prédites par les définitions de l'IWG et l'EWGSOP apparaissent relativement proches (5.1 pour les hommes vs 5.3 et pour les femmes 11.8 vs 13.3) alors que le diagnostic du NIH apparait beaucoup plus sélectif (0.5 pour les hommes et 1.8 pour les femmes). Ces résultats suggèrent que la masse maigre corrigée par le poids du corps (représenté ici par le BMI) apparait comme un bon élément discriminatoire des sujets étant incapables de développer suffisamment de force et de fonction musculaire relative à leur masse corporelle. Finalement, le NIH a intégré dans sa définition la notion de qualité, ou d'efficacité, musculaire qui n'apparait pas dans les définitions de l'IWG et de

l'EWGSOP. Ces dernières ne prennent en compte que la masse maigre par rapport à la taille de l'individu et sa fonction musculaire globale sans tenir compte de sa capacité à mobiliser son propre poids et donc sans discriminer les obèses sarcopéniques [22]. A la suite de ces études, il émerge que **la diminution de la masse musculaire n'est responsable que d'une partie de la perte de fonction**. Dès lors, une récente étude propose une nouvelle terminologie pour s'adapter à l'évolution du concept de sarcopénie et d'autres déficits musculaires liés à l'âge sous le terme de **SMFD** pour ***Skeletal Muscle Function Deficit*** [25].

Par ailleurs, les trois définitions mettent en évidence une susceptibilité supérieure à la sarcopénie chez les femmes. Plusieurs explications à cette différence selon le genre sont imputables au style de vie et aux hormones stéroïdes. En effet, de façon intéressante, une équipe a montré une relation entre les taux circulants des hormones sexuelles diminuant avec l'âge (estrone et œstradiol) et la composition corporelle des femmes caucasiennes dont la masse maigre diminue avec l'âge (mesurée par la masse maigre appendiculaire/taille²) [26]. La précision ethnique apportée ici n'est pas un hasard puisque Wright et ses collègues ont montré que les femmes afro-américaines présentent une masse maigre plus importante que les caucasiennes pour les mêmes taux circulants d'hormones sexuelles féminines [27]. Cependant, les femmes afro-américaines de cette étude présentent une testostéronémie supérieure aux caucasiennes (1.1 vs 0.9 nmol/l) [27]. Au contraire, les populations asiatiques présentent une prédisposition à la sarcopénie plus importante [24]. Un consensus mené par l'*Asian Working Group of Sarcopenia* (AWGS) a retenu une définition proche de celle de l'EWGSOP (perte de la masse, fonction et/ou performance musculaire) et a défini ses propres seuils de diagnostics répertoriés dans le **tableau 1**. Les seuils utilisés sont proches de ceux du NIH avec une prévalence bien supérieure (0.5 vs 6.4 pour les hommes et 1.8 vs 11.5 pour les femmes).

En conclusion, ce premier chapitre nous montre que

- **La sarcopénie se définit par la perte de la masse, de la force et de la performance musculaire au cours du temps.**
- **Son évaluation se réalise principalement par l'évaluation de la vitesse de marche et de la masse maigre par imagerie.**
- **De nouvelles technologies émergent de la recherche fondamentale telles que l'utilisation de créatinine-d3**

PARTIE II

Quels sont les facteurs responsables de la sarcopénie ?

La sarcopénie, processus lent et progressif, est le résultat de modifications **biologiques** et **environnementales** qui surviennent au cours du vieillissement. Parmi les facteurs qui influencent la perte de la masse et de la fonction musculaire, on distingue 2 types de mécanismes. Premièrement, la cellule musculaire elle-même est soumise au vieillissement avec une accumulation d'évènements moléculaires qui participent aux altérations de la fonction des cellules musculaires. Nous appellerons ces paramètres : **mécanismes intrinsèques**. D'autre part, le muscle squelettique est un tissu au sein d'un organisme entier qui subit le vieillissement. Les altérations des organes avoisinant le muscle, notamment par des modifications des facteurs circulants, entrent dans la catégorie des **facteurs extrinsèques** à la cellule musculaire, favorisant la sarcopénie.

I- MECANISMES INTRINSEQUES FAVORISANT LA SARCOPENIE

Nous allons aborder dans ce chapitre, les principales modifications moléculaires qui surviennent au cours du vieillissement d'une cellule musculaire, participant à la diminution de la masse et de la fonction de tissu.

A] Altération de la balance protéique

Le muscle strié squelettique est constitué à 75% d'eau, 20% de protéines et 5% de substances diverses (lipides, glucides, calcium, et autres minéraux). Il est ainsi le centre de plus de la moitié de la synthèse protéique globale de l'organisme [28]. La modulation de l'équilibre entre la production (**protéosynthèse**) et la dégradation (**protéolyse**) des protéines est un enjeu majeur de la régulation de la masse musculaire. Cette régulation est un processus d'un dynamisme remarquable. Ainsi, certains exercices physiques sont reconnus pour stimuler la protéosynthèse (sans modification de la protéolyse) conduisant à une augmentation de la masse musculaire, recherchée dans des buts esthétiques ou de performance. Au contraire, l'immobilisation

(après une fracture ou sédentarité importante) inhibe la synthèse protéique au profit de la dégradation conduisant à la fonte musculaire.

Nous allons décrire dans un premier temps les mécanismes responsables de la synthèse et de la dégradation protéique puis, leurs régulations au cours du vieillissement.

1/ Synthèse protéique

Dans toutes les cellules eucaryotes, le reticulum endoplasmique (RE, appelé aussi reticulum sarcoplasmique spécifiquement dans le muscle) est l'usine de fabrication des protéines. Les ARN messagers (ARNm), issus du noyau, sont pris en charge par un complexe protéique : **le ribosome**. Cet organite est composé d'une petite sous-unité qui se fixe sur l'ARNm puis recrute une grande sous-unité pour débiter la traduction de la séquence nucléique de l'ARNm en enchaînement d'acides aminés. Les séquences protéiques sont ensuite accaparées par des protéines chaperonnes qui se chargent de leur repliement en une forme tridimensionnelle nécessaire à leur fonction.

a. Le ribosome: usine de la biosynthèse protéique

Les ribosomes, responsables de la biosynthèse protéique, sont principalement associés aux membranes du réticulum endoplasmique, du noyau, des mitochondries ou sous forme libre dans le cytoplasme. L'activité ribosomale est contrôlée par le complexe mTORC1, composé en partie de mTOR (pour *mammalian target of rapamycin*) et de Raptor, une protéine co-activatrice. L'inhibition de la protéogénèse musculaire par la rapamycine qui est un répresseur spécifique de mTOR, montre le rôle primordial de cette protéine dans les processus de synthèse protéique [29]. Les mécanismes de phosphorylation de mTOR au sein de mTORC1 sont encore peu connus mais semblent permettre l'activation des facteurs d'initiation de la traduction protéique à travers le ribosome. En aval, mTOR phosphoryle 4EBP-1 (*Eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1*) qui séquestre le facteur d'initiation de la traduction eIF4E (**figure 5**). Une fois libre, eIF4E permet la reconnaissance entre l'ARNm et le ribosome nécessaire à l'initiation de la traduction des ARNm en protéines. D'autre part, mTOR, via la phosphorylation de la p70S6 Kinase, active également la protéine S6 du ribosome

qui va elle aussi permettre d'initier les mécanismes de traduction protéique [30]. L'activation parallèle d'eIF4E et de S6 est essentielle pour le recrutement de l'ARNm à la petite sous-unité ribosomique, la reconnaissance de la séquence codante et l'initiation de l'élongation.

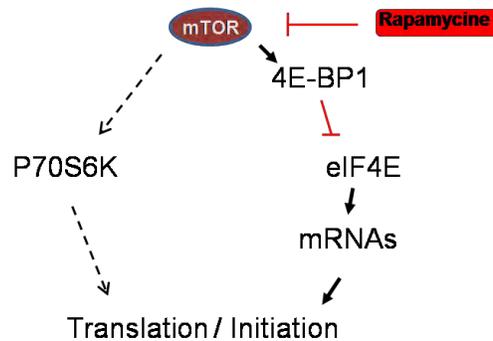


Figure 5: Schema résumant les actions de mTOR dans les processus d'initiation de la traduction des ARNm en protéine

b. Les protéines chaperonnes et le contrôle qualité

Après la synthèse des protéines par assemblage des acides aminés (aa) dans le ribosome, une phase de maturation des protéines est initiée *via* le repliement tridimensionnel des protéines. Si la plupart des protéines sont capables de réaliser cette étape seules, il existe des protéines, appelées **chaperonnes**, qui se fixent aux protéines néosynthétisées à leur sortie du ribosome pour les guider dans leur repliement en structure secondaire, tertiaire ou quaternaire. De plus, ces protéines chaperonnes entraînent également des modifications de conformation de protéines matures permettant leur transport à travers les membranes cellulaires afin de rejoindre un compartiment comme la mitochondrie par exemple. Certaines de ces protéines, appelées Hsp (pour *Heat Shock Protein*), sont activées en cas de stress cellulaire, notamment la chaleur, et permettent de protéger, maintenir et réguler la conformation et donc la fonction des protéines auxquelles elles s'associent.

La protéine Hsp 70 (la plus étudiée) est retrouvée diminuée avec l'âge chez le rat. De façon intéressante, un modèle murin de surexpression génique de cette protéine protège contre les altérations musculaires liées au vieillissement [31]. Bien que les mécanismes par lesquels Hsp70 régule la taille et la fonction des fibres musculaires

soient encore à déterminer, quelques éléments de réponse ont été apportés par l'équipe de Lynch [32]. Dans leur étude, le lien entre Hsp 70 et la fonction musculaire a été attribué à l'interaction entre la protéine chaperonne et SERCA (sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase), une ATPase responsable des flux de calcium dans la cellule musculaire, élément clef de la contraction musculaire [32].

2/ Dégradation protéique ou protéolyse

La dégradation protéique participe au renouvellement protéique, en libérant des acides aminés qui permettront la synthèse de nouvelles protéines. Il existe deux voies principales de protéolyse : **le système ubiquitine-protéasome (UPS)** et **l'autophagie**. Bien qu'elle participe principalement au renouvellement protéique, la dégradation par l'UPS est un système dynamique permettant de maintenir le pool des acides aminés pendant un jeûne court [33]. Au contraire, l'autophagie, dépendante de la voie lysosomale, dégrade principalement les protéines à durée de vie longue et maintien le pool d'acides aminés en cas de jeûne prolongé [34].

a. Protéolyse par le système ubiquitine-protéasome (UPS)

Les protéines du muscle squelettique sont majoritairement dégradées par la voie dépendante de l'Ubiquitine-protéasome (UPS) dont la découverte a fait l'objet du prix Nobel de chimie en 2004 [35]. L'ubiquitine, comme son nom l'indique, est présente dans tous les compartiments subcellulaires de toutes les cellules de l'organisme. L'ubiquitination correspond à la fixation d'une ou plusieurs ubiquitines (formant une chaîne) sur une protéine comme signal de dégradation. La liaison covalente d'une chaîne d'ubiquitines sur la protéine cible est un processus post traductionnel très sophistiqué qui fait l'objet de nombreux travaux de recherches encore aujourd'hui [36] [37]. Ce processus se réalise en deux étapes : 1) le recrutement de la protéine cible et 2) sa dégradation. La première étape, également appelée poly-ubiquitination, est orchestrée par trois enzymes ATP-dépendantes : E1, activatrice de l'ubiquitine, E2 conjuguant l'ubiquitine à E3, une ligase permettant la liaison covalente d'une nouvelle ubiquitine à la dernière ubiquitine formant la chaîne pré-existante. Parmi les ubiquitines ligases E3, MuRF-1 (*Muscle Ring Finger protein 1*) et MAFbx (*Muscle Atrophy F-*

box)/Atrogin1 sont spécifiques du tissu musculaire strié squelettique et responsables notamment de la dégradation des protéines sarcomériques et myofibrillaires telles que les myosines à chaînes lourdes permettant la contraction [38]. La protéine identifiée comme substrat à dégrader grâce à la queue d'ubiquitines sera spécifiquement orientée vers le protéasome, présent dans le noyau et le cytosol de toutes les cellules [39] (**Figure 6**).

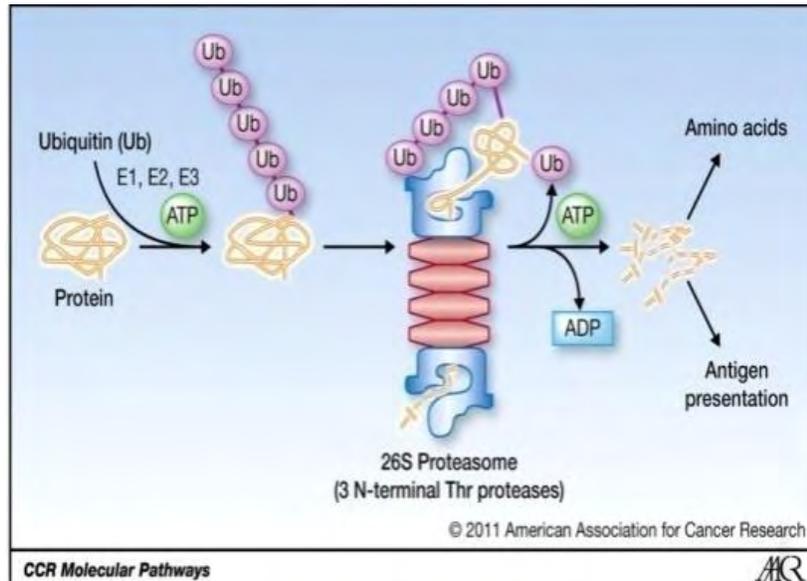


Figure 6: Dégradation des protéines par le protéasome [40].

Les ubiquitines sont organisées en chaîne attachées entre elles par les ubiquitines ligase (E1, E2 et E3) par un résidu lysine sur la protéine à dégrader. Le complexe protéine-ubiquitine est transporté au protéasome où la chaîne est détachée, la protéine, dépliée par des mécanismes dépendants de l'ATP est transloquée dans le protéasome où elle est dégradée par des protéases en petits fragments peptidiques.

La forme la plus répandue de protéasome est la forme 26S (appelée ainsi par son coefficient de sédimentation en Svedberg). Le protéasome 26S est formé d'une sous-unité catalytique (20S) ATP-dépendante et de deux sous unités régulatrices (19S et 11S) qui permettent la reconnaissance des protéines substrats, leur dé-ubiquitination et leur dégradation (**Figure 6**) [40]. De nombreuses zones d'ombres concernant les mécanismes de régulation du protéasome persistent à ce jour. En effet, très peu de choses sont connues en ce qui concerne l'entrée de la protéine-substrat dans le protéasome et la sortie des produits de dégradation. Néanmoins, le protéasome contient 3 thréonines protéases qui clivent les liaisons peptidiques reliant deux acides aminés d'une protéine [41]. Cette dégradation génère ainsi de petits peptides d'acides aminés, réutilisés pour la synthèse de nouvelles protéines [41].

b. Autophagie

L'autophagie est un mécanisme de maintien de l'homéostasie cellulaire très conservé. Longtemps considéré comme responsable de la dégradation non sélective de protéines à longue durée de vie, de plus en plus d'évidences suggèrent au contraire une spécificité dépendante des organelles, telle que la mitochondrie (dans ce cas elle prend le nom de mitophagie) ainsi que des agrégats protéiques par exemple. Il existe trois types d'autophagie : **macro-autophagie**, **micro-autophagie** et **l'autophagie médiée par les protéines chaperonnes**. Seule la macro-autophagie est décrite dans ce manuscrit, étant la plus étudiée et connue pour son implication dans de nombreuses pathologies musculaires.

Comme le montre la **figure 7**, la première étape est la formation de l'**autophagosome**. Il englutit les éléments cytosoliques à dégrader tels que des protéines aberrantes et organelles défectueux ou surnuméraires. Les étapes très précoces de formation de la membrane sont mal connues. Cependant, certains éléments laissent entendre qu'il s'agirait d'un segment de membrane du RE ou de la mitochondrie qui aurait bourgeonné. En réponse à un stress cellulaire, la sérine/thréonine kinase Ulk1 cytosolique, recrute le complexe de la protéine Beclin-1 (aussi appelée Atg6 pour *Autophagy gene related*) et VPS34 (*Vacuolar Protein Sorting*, une PI3-K de classe III), responsable de la formation du **phagophore**, premier segment de membrane qui va ensuite s'allonger et former une vésicule : l'**autophagosome**. Deux systèmes reposant sur le principe de l'ubiquitination des protéines décrit ci-dessus participent à l'élongation du phagophore. Le premier est la conjugaison de complexes Atg5-Atg12-Atg16 au phagophore grâce à Atg7 jouant le rôle d'E1 et Atg10, celui d'E2. Cette construction permet ensuite la conjugaison de la protéine LC3-I (aussi appelé Atg8) et GABARAP (*γ aminobutyricacid receptor-associated protein*), qui prend le nom de LC3-II, une fois conjuguée à un Phosphatidyl Ethanolamine (PE) (LC3-II = GABARAP/PE). Ainsi incorporées dans la membrane de l'autophagosome, ces protéines sont appelées « adaptateur de l'autophagie ». Les deux complexes Atg5/6/12 et LC3 II-PE répartis de part et d'autre de la membrane ont un rôle structural qui permet l'élongation du phagophore qui va se refermer prenant le nom d'autophagosome séquestrant le *cargo*, nom donné aux éléments cytosoliques à dégrader. Pendant longtemps, l'autophagie a été considérée comme un mode de dégradation non

spécifique, or, au cours de la formation de l'autophagosome, le *cargo* se lie aux protéines adaptatrices (LC3/Atg8,...) par l'intermédiaire de « récepteurs » de l'autophagie dont la protéine p62 ou séquestrome-1, qui sont dégradés avec le substrat. Ces récepteurs forment un pont entre l'autophagosome et le *cargo* et sont responsables de la reconnaissance sélective de la cible à dégrader. La poly-ubiquitination des éléments cytosoliques est le principal mode de sélection reconnu par les récepteurs de l'autophagie.

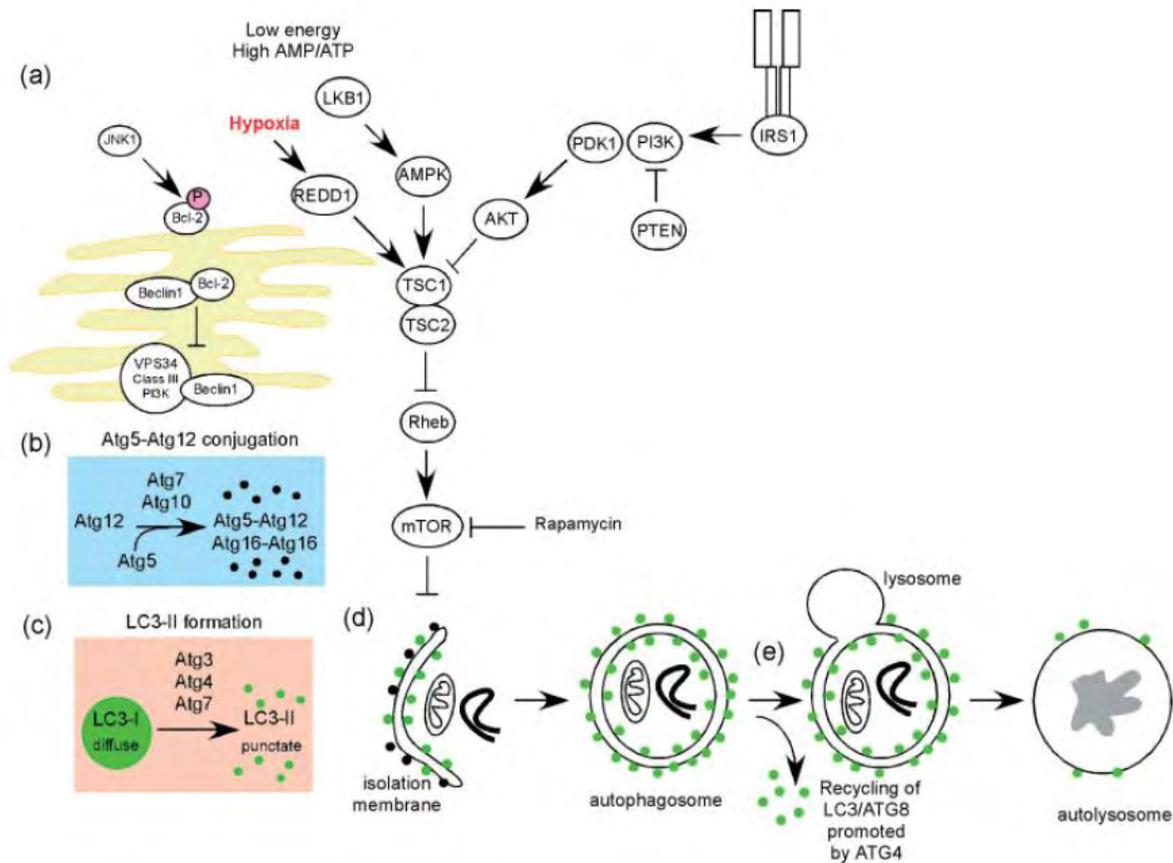


Figure 7 : Mécanismes moléculaires d'initiation de l'autophagie.

Sous l'influence d'un stress cellulaire, le recrutement de Beclin1 et VPS34 initie la formation d'un phagophore. Les conjugaisons à la membrane du phagophore avec Atg5/Atg12/Atg16 et LC3/PE permettent son élongation jusqu'à sa fermeture séquestrant les éléments à dégrader. Atg 5, 12, 16, LC3 et PE sont recyclés dans le cytosol. L'autophagophore ainsi formé va fusionner avec le lysosome formant un autophagolysosome, lieu de dégradation par hydrolyse du substrat de l'autophagie.

Comme décrit dans la **figure 7**, les membranes de l'autophagosome et du lysosome vont fusionner, formant l'**autophagolysosome**. Le cargo va ainsi être dégradé par les hydrolases issues du lysosome (**figure 7**).

3/ Régulation de la balance protéique au cours du vieillissement

Au sein d'une cellule musculaire il existe deux grands acteurs qui régulent la balance protéique du muscle squelettique : la voie **PI3k/Akt** et l'**AMPK**, protéine kinase dépendante de l'AMPc.

La synthèse protéique est en partie régulée par les substrats eux-mêmes tels que les acides aminés, et plus particulièrement les acides aminés essentiels apportés par l'alimentation. Cependant, il apparaît avec l'âge une diminution de la sensibilité du muscle squelettique aux substrats, appelée « résistance anabolique ».

Nous allons voir comment, au cours du vieillissement, les voies de signalisation intra cellulaires et la résistance anabolique font pencher la balance protéique en faveur de la dégradation, élément majeur de la perte de la masse musculaire.

a. Régulation de la balance protéique par la voie PI3k/Akt

La voie PI3k/Akt est sollicitée dans des contextes physiologiques nécessitant une synthèse protéique musculaire consécutive à un stimulus comme par exemple un repas, un exercice physique ou la stimulation par des facteurs de croissance comme l'insuline ou la testostérone. L'activation par phosphorylation de la PI3K (*Phospho Inositide 3-Kinase*) permet la stimulation par phosphorylation de la protéine Akt aussi appelée PKB (Protéine Kinase B), localisée à la membrane plasmique des cellules. Parmi les différentes voies régulées en aval d'Akt, on retrouve celles de la balance protéique. En effet, Akt œuvre dans le sens de la protéosynthèse en activant alternativement la voie dépendante de mTOR et en inhibant la protéolyse via FoxO (*Forkheadbox O*) [42]. Plus en détails, Akt phosphoryle les complexes TSC 1 et 2 (*Tuberous Sclerosis Complexe*) ce qui aura pour effet de lever l'inhibition qu'ils exercent sur mTOR, qui, comme nous l'avons vu précédemment peut alors activer P70S6K et 4EBP1 (**figure 8**). Akt est aussi capable d'inhiber la voie dépendante du facteur de transcription FoxO, activateur de la dégradation protéique par l'UPS et l'autophagie. La famille des FoxO est composée de facteurs de transcription cytosoliques qui, en réponse à une stimulation (exercice physique, nutrition,...) sont transférés au noyau afin de réguler l'expression d'un nombre conséquent de gènes cibles. Parmi les 6 membres de la famille des FoxO, tous exprimés dans le muscle squelettique, seuls FoxO1 et 3 activent les deux voies

majeures de dégradation protéique que sont l'UPS et l'autophagie de façon indépendante l'une de l'autre. FoxO1 et 3, une fois transférés dans le noyau, agissent sur le promoteur des ligases E3 MAFbx/atrogin 1 et MurF1 en induisant leurs transcriptions et permet ainsi l'activation du protéasome [43]. A ce rôle de FoxO3 sur l'activation du protéasome s'ajoute sa capacité suffisante et nécessaire à la coordination de l'autophagie dans le muscle par le contrôle transcriptionnel de plusieurs facteurs comme LC3, Bnip3, certaines Atgs, Beclin2 et Ulk2 [44]. D'un autre côté, FoxO1 contrôle la transcription de la Cathepsine L, une protéinase lysosomale permettant de dégrader elle aussi les protéines [45]. L'activation de la voie PI3K/Akt entraîne la phosphorylation des FoxO (sur des résidus Thr32, Ser253 et Ser315), ce qui empêche leur translocation au noyau et les séquestre dans le cytosol d'où elles ne peuvent plus jouer leurs rôles de facteur de transcription [46].

Avec l'âge, des modifications de facteurs extrinsèques comme la diminution des hormones, les facteurs de croissance et la diminution de l'apport protéique par l'alimentation (détaillés dans un chapitre suivant) limitent la sollicitation de la voie PI3K/Akt musculaire qui est, par conséquent, quantitativement moins activée. Par ailleurs, en l'absence de stimulation, les muscles squelettiques de rats âgés présentent une diminution de l'expression des protéines impliquées dans la synthèse protéiques comme Akt, mTOR, P70S6K et la protéine ribosomale s6 [47]. Le vieillissement musculaire est également associé à des altérations dans l'activation de ces voies. En effet, on observe des modifications qualitative et quantitative dans la phosphorylation d'Akt conduisant à une augmentation du ratio $Akt^{Ser\ 479}/Akt^{Th308}$ [48]. Or, au cours d'un stress du réticulum endoplasmique dans des cellules de choriocarcinomes en culture, la modification de ce ratio est associée à une altération de la reconnaissance des substrats par Akt [49]. Ce mécanisme pourrait potentiellement expliquer la diminution de la signalisation initiée par Akt telle que la diminution de la phosphorylation de mTOR et P70S6K, observée chez des rats âgés de 27 mois [49]. Par ailleurs, les altérations d'Akt diminuent la séquestration des FoxO dans le cytoplasme. FoxO 1 et 3 sont ainsi transloqués au noyau, initiant la dégradation protéique par l'UPS et l'autophagie [50]. En plus de ces modifications intrinsèques des voies cellulaires, chez des rats âgés, la voie PI3K/Akt apparait moins sensible aux stimuli extérieurs comme l'activité physique par rapport à des rats plus jeunes [51].

b. Régulation de la balance protéique par l'AMPK

La protéine kinase activée par l'AMPc (AMPK) est un senseur central du statut énergétique d'une cellule qui est sensible aux variations d'ATP intracellulaires et joue un rôle primordial dans l'adaptation de la réponse cellulaire. Cette hétéroprotéine, constituée de 3 sous-unités (α , β , et γ) est, au niveau du muscle squelettique, majoritairement composée des sous-unités $\alpha 2$ et $\beta 2$. Son activation dépend de la phosphorylation de la sous-unité $\alpha 2$ sur la thréonine 172 consécutive à un stress cellulaire causé par des hormones (leptine, norépinéphrine, ...), un exercice physique ou encore l'alimentation. L'AMPK active différentes voies cellulaires qui vont conduire la cellule à un changement du statut métabolique de l'anabolisme vers le catabolisme. A l'inverse, l'inactivation génétique de l'AMPK chez la souris altère drastiquement les capacités d'exercice physique et les fonctions mitochondriales musculaires [52].

En ce qui concerne son rôle sur la balance protéique, l'AMPK a récemment été reconnue comme un activateur de l'autophagie. En effet, comme le montre la **figure 8**, l'AMPK est capable d'une part d'inhiber la protéosynthèse *via* mTOR et d'autre part de stimuler l'autophagie et la dégradation protéique dépendante de l'UPS *via* Ulk1 (facteur initiateur de la formation de l'autophagosome) et FoxO3. En réponse à une diminution de l'ATP cellulaire, l'AMPK activée inhibe directement la synthèse protéique par deux voies : la phosphorylation activatrice de TSC2 (inhibiteur de mTORC1), et de Raptor (protéine de régulation associée à mTOR) [53].

Parallèlement, l'AMPK stimule directement et indirectement (*via* FoxO3) l'autophagie. En effet, au cours de situations de carence en glucose dans des cellules HEK293 (lignée de cellules embryonnaires de reins humains), Kim et ses collaborateurs ont pu montrer une activation de la kinase initiateur de l'autophagie Ulk1 dépendante de la phosphorylation des résidus Serine 317 et 757 par l'AMPK. Au contraire, lorsque l'apport énergétique est suffisant, l'activité importante de mTOR limite l'activation d'Ulk1 par la phosphorylation de la sérine 757, empêchant l'interaction entre Ulk1 et l'AMPK [54]. L'AMPK active également l'autophagie de façon indirecte en relocalisant FoxO3 au niveau nucléaire où il entraîne la transcription de gènes impliqués dans la dégradation protéique par l'UPS et l'autophagie dans des cellules musculaires *in vitro* et chez la souris [55].

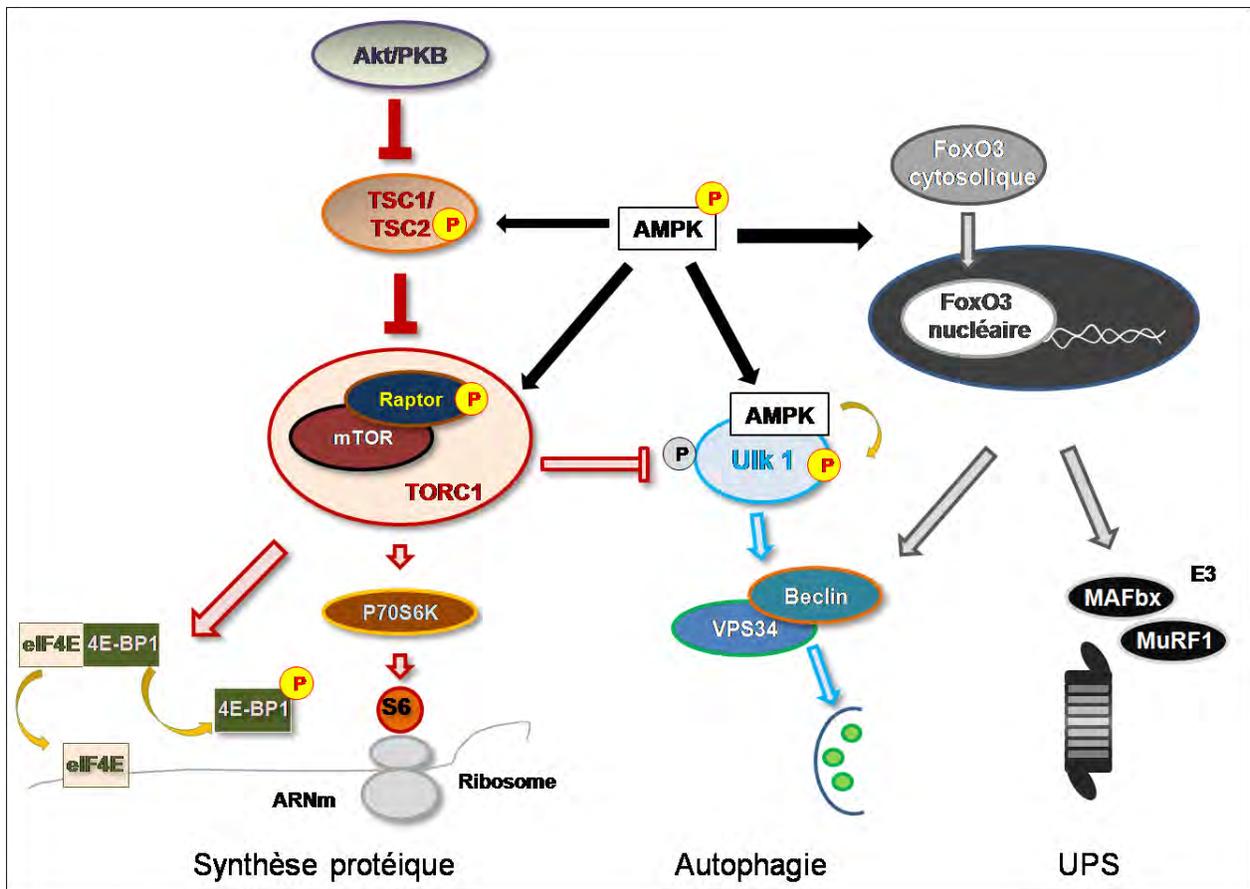


Figure 8 : Régulation de la balance protéique par les voies PI3K/Akt et AMPK

Au cours du vieillissement, on observe une diminution de l'expression de la protéine AMPK dans le muscle strié squelettique [47] ainsi qu'une altération de son activation.

Reznik et al ont démontré cette capacité d'activation diminuée chez des rats âgés en observant une diminution de la phosphorylation de l'AMPK au cours de traitements par de l'AICAR (5-Aminoimidazole-4-Carboxamide Ribonucléotide, activateur de l'AMPK) ou lors d'un exercice physique [56]. Enfin, d'après Salminen et Kaarmiranta, la diminution de l'autophagie observée au cours du vieillissement est aussi partiellement imputable à l'altération de fonction de l'AMPK [57].

De façon intéressante, les souris âgées de 18 mois invalidées pour les sous-unités $\beta 1$ et $\beta 2$ de l'AMPK spécifiquement dans le muscle squelettique présentent des **altérations musculaires** associées à une forte diminution de l'autophagie [58].

De plus, l'AMPK peut phosphoryler PGC-1 α qui est capable de bloquer la fixation de FoxO3 aux éléments de réponse du promoteur des ligases de l'UPS, MaFbx/Atrogin-1

et MurF1. La surexpression de PGC-1 α dans le muscle squelettique augmente le ratio LC3-II/LC3-I, témoin d'une diminution de l'autophagie. Ainsi l'activation de PGC-1, notamment par l'AMPK, protège le muscle squelettique des rats âgés de l'autophagie et de la dégradation protéique par l'UPS [59] [60].

c. Résistance anabolique

Nous avons déjà vu que la voie PI3K/Akt était moins sensible à la contraction musculaire au cours du vieillissement. De la même façon, les patients âgés présentent des altérations de cette voie lorsqu'elle est sollicitée par l'afflux d'acides aminés. Dans le muscle squelettique, la balance protéique est régulée tout au long de la journée. Ainsi, au cours des périodes interprandiales, la synthèse protéique est diminuée au profit de la dégradation alors qu'en période postprandiale, l'apport de protéine par l'alimentation stimule la synthèse protéique et inhibe la protéolyse dépendante du protéasome.

Différents travaux ont pu montrer que la pratique d'une activité physique ou l'ingestion d'une dose protéique stimulaient la synthèse protéique musculaire *via* la voie PI3K/Akt/mTOR chez les rats jeunes mais pas chez les rats âgés [61] [62]. L'utilisation de doses plus élevées de protéines ou de charges physiques plus importantes est capable par ailleurs, d'activer la protéosynthèse chez des animaux âgés, suggérant une notion de **seuil de stimulation** nécessaire à l'activation des voies de signalisation responsables de la protéosynthèse [28]. Par ailleurs, il est intéressant de noter que l'apport protéique régule la balance protéique en stimulant la protéosynthèse et en diminution la protéolyse. Ainsi, chez des rats âgés, on peut observer une **perte de l'inhibition de la protéolyse** en réponse à l'alimentation [63]. Tous ces éléments ont conduit à décrire l'apparition de phénomènes de **résistance anabolique** quel que soit l'état de santé des personnes âgées. Ces régulations physiologiques, auxquelles s'ajoute une diminution de la prise alimentaire (donc de l'apport en acides aminés) [64], sont décrites dans des contextes de sarcopénie comme étant en grande partie responsables de la diminution protéique à l'origine de la perte de la masse musculaire.

La balance protéique, altérée au cours du vieillissement, est un élément majeur favorisant la sarcopénie et plus particulièrement la perte de la masse musculaire. Pour restaurer cette balance au cours du vieillissement, il apparaît stratégique de cibler la protéosynthèse comme décrit dans les approches d'entraînement physique et de supplémentation nutritionnelle en protéines.

B] Dysfonctions mitochondriales

Les mitochondries sont des organites intracellulaires qui jouent le rôle de « centrales énergétiques » des cellules musculaires permettant d'apporter l'énergie nécessaire aux mécanismes de contraction. Cependant, nous allons voir qu'au cours du vieillissement musculaire, cet organite présente des altérations ne lui permettant plus d'assurer son rôle de fournisseur d'énergie et pouvant même aller jusqu'à avoir une action délétère sur le fonctionnement de la cellule par l'intermédiaire de la génération d'un stress oxydant.

1/ Les mitochondries du muscle squelettique

Les mitochondries sont des organites retrouvés dans toutes les cellules eucaryotes et qui possèdent leur propre génome. Leur rôle physiologique est primordial puisqu'elles permettent, grâce à la chaîne respiratoire mitochondriale, de transformer les molécules organiques en ATP, principale ressource énergétique des cellules. Elles sont formées à partir de la collaboration entre des protéines issues du génome nucléaire et mitochondrial.

a. La biogénèse mitochondriale

La biogénèse mitochondriale peut se définir par l'expansion et la division d'une mitochondrie pré existante. En raison de leur origine bactérienne, les mitochondries ont

la capacité d'auto réplication. Les principaux régulateurs de la production de nouvelles mitochondries sont les **PGC-1** (*Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Coactivator 1*) α et β . PGC-1 α est un coactivateur de la transcription. Il est connu notamment pour se lier à NRF2 (*Nuclear Respiratory Factor 2*), entraînant la coactivation de NRF1. Les NRFs (1 et 2) régulent la transcription de TFAM (*mitochondrial transcription factor A*). Ce dernier facteur est directement responsable de la transcription de gènes issus de l'ADN mitochondrial et de sa réplication. Parallèlement, les NRFs régulent la transcription de gènes codant pour des protéines nécessaires à la biogénèse mitochondriale [65]. Les protéines issues du génome nucléaire sont acheminées vers la mitochondrie par des protéines chaperonnes (comme HsP70). Là, elles seront alors dépliées et importées à travers les membranes externes et internes des mitochondries *via* des translocases TOM et TIM (pour *Translocase of the Outer Membrane Complex* et *Translocase of the Inner Membrane Complex*). Une fois dans la mitochondrie, elles vont s'assembler avec les protéines issues de l'ADN mitochondrial (suite à l'action de Tfam) pour former les unités fonctionnelles comme les sous-unités de la chaîne respiratoire mitochondriale. La présence de ces protéines, associée à la réplication de l'ADN régulée par Tfam, va induire la division de la mitochondrie par un mécanisme de fission. Les protéines clés mises en jeu au cours de l'étranglement de la mitochondrie sont les Drp (*Dynamain related-protein*). Ainsi, l'expression protéique de Drp1 est utilisée comme marqueur de la fission (**figure9**) [65]. Drp1 appartient à la famille des dynamines. Ce sont des GTPases normalement situées dans le cytoplasme et qui sont recrutées à la membrane externe de la mitochondrie par des mécanismes encore mal connus. Drp1 s'oligomérisse en formant une spirale qui va, par l'hydrolyse d'un GTP, changer de conformation et induire la fission par étranglement de la mitochondrie [66] [67].

Chaque mitochondrie est normalement capable d'assurer son propre contrôle qualité. Ainsi, lors de stress cellulaires (exercice physique, exposition aux UV ou aux radicaux libres) induisant des altérations de l'organite (comme la fragmentation de l'ADN mitochondrial ou une détérioration d'une partie de la mitochondrie), des mécanismes de défense sont mis en jeu. Parmi les processus activés, on retrouve les voies de la réparation de l'ADN mitochondrial, les protéines chaperonnes qui prennent en charge les protéines mal repliées et un système de dégradation des protéines aberrantes dépendant des protéases. Lorsque ces mécanismes de compensation ne suffisent pas à restaurer un bon fonctionnement de l'organite, elle peut fusionner avec une

mitochondrie voisine intacte. Ceci permettra de neutraliser les altérations ou de les compenser, par un processus que l'on peut apparenter à une « dilution » des éléments mitochondriaux défectueux. Cependant, si cela ne suffit pas, les mitochondries ou fragments de mitochondries défaillants peuvent être isolés des mitochondries intactes par fission générant une mitochondrie *filie* aberrante qui sera ensuite dégradée [68]. Les mécanismes de fusion et fission des mitochondries sont abordés dans le chapitre suivant.

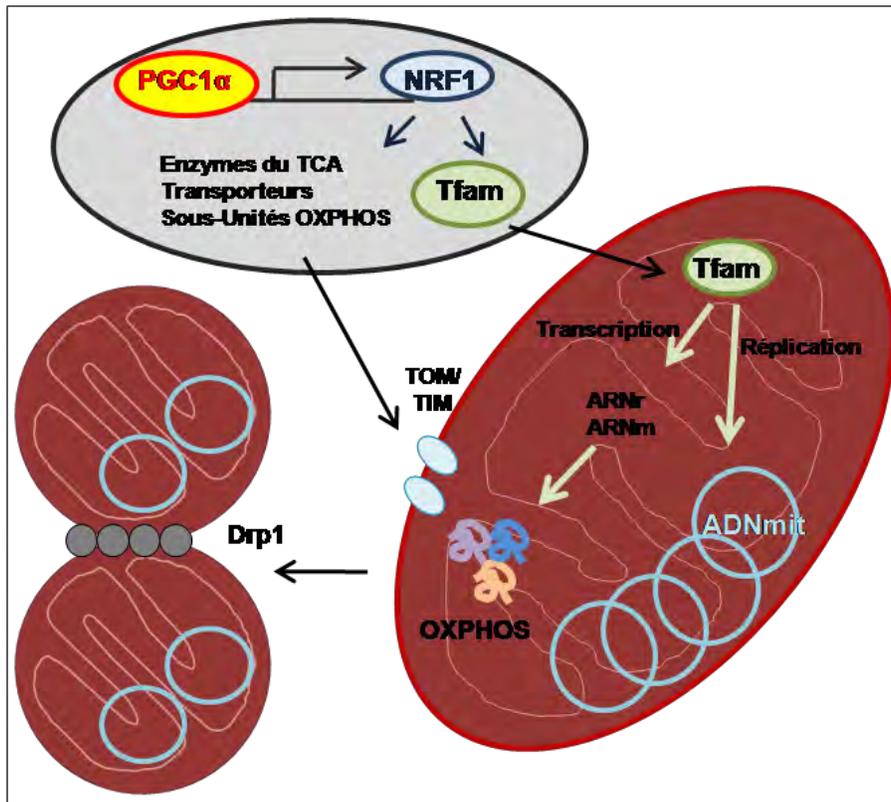


Figure 9 : Mécanismes de biogénèse mitochondriale.

PGC1 α active la transcription de NRF1 qui permet la transcription de Tfam d'une part, et des ARNm codants pour des protéines mitochondriales comme les enzymes du cycle de Krebs (défini plus bas) et les sous-unités de la chaîne respiratoire (OXPHOS). Le facteur de transcription Tfam est transporté dans la mitochondrie où il va orchestrer la production de protéines issues du génome mitochondriale ainsi que la réplication de l'ADN mit. Les protéines issues des génomes nucléaires et mitochondriaux s'assemblent pour former les unités fonctionnelles de la mitochondrie, puis elle se divise en deux par étranglement. La fission de la membrane externe est prise en charge par les DRP1, celle de la membrane interne par OPA1.

Le renouvellement des mitochondries est assuré par leur autophagie sélective, appelée **mitophagie**. Comme pour l'autophagie classique avec les protéines altérées, la mitochondrie, qui est ici l'élément à dégrader, est reconnue et marquée par des ubiquitines grâce à une ligase spécifique qui joue le rôle d'E3 : **la parkine**. En effet, des protéines PINK 1 (*PTEN-Induced Putative Kinase 1*) s'accumulent à la surface de la

mitochondrie et recrutent la parkine qui, par sa fonction de ligase, permet l'ubiquitination des protéines présentes à la surface de membrane externe. La mitochondrie ainsi marquée se lie à p62 qui participe au recrutement de l'autophagosome en se fixant à LC3-I. La parkine est aussi capable d'activer la molécule Ambra1 (*Beclin1-regulated autophagy*), initiatrice de la formation du phagophore. Le rôle important de cette enzyme dans la physiologie de la mitochondrie a pu être montrée grâce à une mutation responsable de l'altération de la fonction de la parkine à l'origine d'une forme héréditaire d'une pathologie neurodégénérative : la maladie de Parkinson [69]. Par ailleurs, la mitophagie peut avoir lieu indépendamment de la parkine. Soit par une ubiquitination médiée par SMURF1 (*SMAD-specific E3 Ubiquitin protein ligase 1*), soit par le recrutement direct de LC3-I et de l'autophagosome à la mitochondrie par FUNDC1 (*FUN14 domain-containing protein 1*), BNIP3 (*Bcl2/adenovirus E1B 19 kD protein-interacting protein 3*) ou NIX (*Nip3-like protein X*). Nous verrons dans le prochain chapitre que ces mécanismes, contrôlant la fusion et la fission des mitochondries, sont altérés au cours du vieillissement.

b. Le dynamisme mitochondrial du muscle squelettique

Le muscle squelettique contient deux populations de mitochondries caractérisées par leur localisation mais également par leurs propriétés bioénergétique et morphologique. Comme le montre la **figure 9**, les mitochondries sub-sarcolemmales (SS), se situent sous la membrane plasmique des cellules musculaires alors que les mitochondries intra-myofibrillaires (IMF) sont situées entre les myofibrilles constituant les fibres musculaires. Au niveau morphologique, les SS apparaissent isolées, sphériques et de petite taille alors que les IMF sont allongées, tubulaires, ramifiées et accolées les unes aux autres allant jusqu'à former des réseaux capables de diffuser rapidement l'énergie aux différentes myofibrilles qui forment la cellule très dense [70]. Il existe une continuité entre les deux sous populations assurant un échange d'informations. Par ailleurs, la biogénèse mitochondriale a majoritairement lieu au niveau des SS donnant naissance à des mitochondries nouvellement formées qui semblent ensuite migrer dans les régions intermyofibrillaires [71]. Au niveau énergétique, de façon cohérente avec leur localisation et leur structure, les IMF semblent plutôt spécialisées dans la production d'énergie pour la contraction [72]. En

effet, en comparaison des SS, les IMF ont une capacité de phosphorylation oxydative supérieure, associées à une moindre libération d'espèces réactives de l'oxygène (ERO), principale source du stress oxydant de la cellule [73] (**figure 9**).

La régulation de la morphologie des mitochondries est un élément clé pour le maintien de leur homéostasie. Cette régulation se fait par le biais de mécanismes de fusion et de fission des mitochondries. Les mécanismes de fission dépendant de Drp1 ont été évoqués dans la biogénèse mitochondriale. En ce qui concerne la fusion, elle est régulée par les GTPases Mitofusines 1 et 2 (Mfn1 et 2) et la dynamine OPA1 (Optic Atrophy 1). Les mécanismes ne sont pas clairement élucidés, mais il apparaît que les mitofusines s'associent pour induire l'accolement des membranes externes de deux mitochondries de façon dépendante du GTP. La fusion des membranes internes est ensuite prise en charge par OPA1 [74]. C'est ainsi que la balance fusion/fission est évaluée par le ratio Mfn2/Drp1.

Le vieillissement musculaire est associé à des modifications fonctionnelles et morphologiques des mitochondries.

G. Gouspillou a pu montrer en 2015 une perte de la circularité ainsi qu'une augmentation de la taille des mitochondries subsarcolemmales et une augmentation de l'élongation et de la complexité des mitochondries intramyofibrillaires dans les muscles squelettiques de souris de 22 mois. De plus, un déséquilibre dans le ratio Mfn2/Drp1 en faveur de la fusion participe à l'accumulation de mitochondrie de grande taille [75]. Au niveau fonctionnel, une étude comparative de la fonction et de la biogénèse mitochondriale des IMF et SS chez des rats âgés a montré une altération de la respiration mitochondriale dans les deux populations, ainsi qu'une augmentation des ERO et une plus grande sensibilité à l'apoptose (mesurée par la libération de cytochrome C et d'EndoG dans le cytoplasme). De façon intéressante, cette étude a mis en évidence que les mitochondries SS présentaient des altérations plus marquées que les mitochondries IMF, suggérant une plus grande susceptibilité au vieillissement, bien que les mécanismes sous-jacents restent encore à être élucidés [76] (**figure 8**).

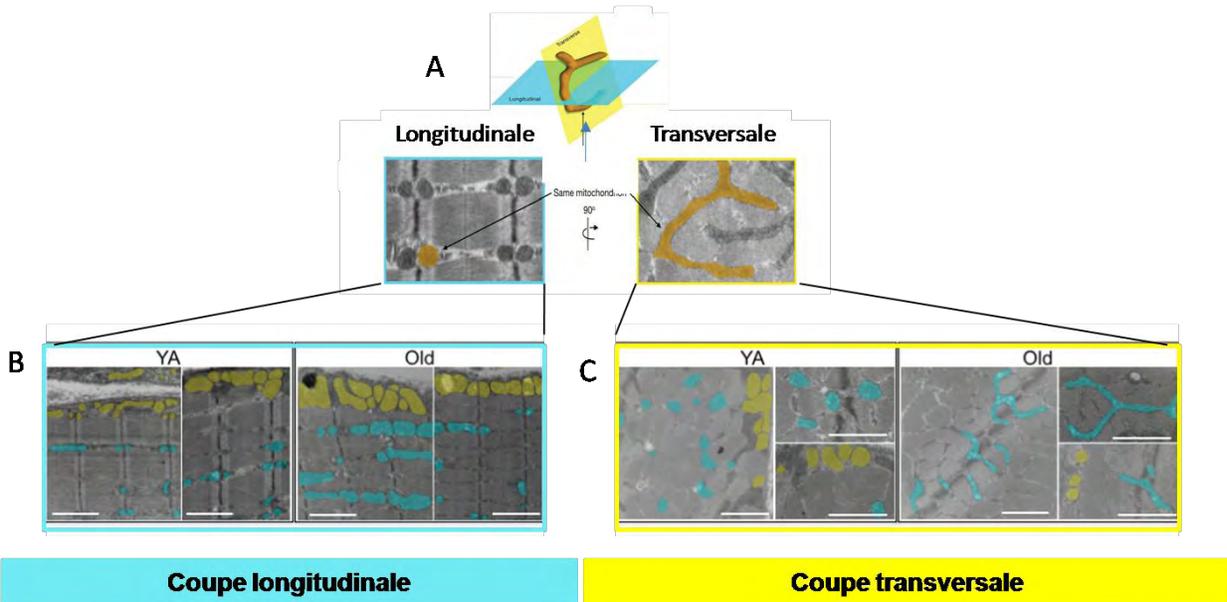


Figure 9: Effet de l'âge sur la morphologie de mitochondries SS et IMF

A : Présentation de l'orientation transversale et longitudinale de la fibre musculaire squelettique en Microscopie Electronique. **B** : Comparaison morphologiques de mitochondries subsarcolemmales (en jaune) et intermyofibrillaires (en bleu) sur coupe longitudinale et **C** transversale de muscle striée squelettique de souris.

Une théorie intéressante suggère qu'au cours du vieillissement, la mitophagie diminue dans les cellules post-mitotiques comme les cellules musculaires qui ont un très faible potentiel de division [77]. L'accumulation de mitochondries altérées génère ainsi un stress énergétique qui conduit à un déséquilibre de la balance fusion-fission en faveur de la fusion [77]. Ces phénomènes sont à l'origine de l'accumulation de mitochondries géantes possédant des capacités oxydatives augmentées [77] permettant probablement de compenser le stress énergétique ainsi produit. De plus, les mitochondries de grandes tailles ne pouvant pas être prises en charge par les mécanismes de mitophagie, les altérations de morphologie et de fonction mitochondriale seraient le fruit d'un cercle vicieux.

c. La fonction mitochondriale

La fonction principale de la mitochondrie est de synthétiser l'ATP à partir de molécules organiques énergétiques comme le glucose et les acides gras (AG). Cette production d'ATP est réalisée grâce à un processus aérobie (dépendant de l'oxygène) qui se déroule en 3 étapes schématisées dans la **figure 10**.

- 1) **Dans le cytoplasme** : transformation du glucose en pyruvate au cours de la glycolyse et activation des acides gras en acylcarnitine,
- 2) **Dans la mitochondrie** : production d'Acétyl-CoA à partir des Acylcarnitines par la β oxydation.
- 3) **Dans la mitochondrie** : phosphorylation oxydative au sein du cycle de Krebs et de la chaîne respiratoire.

Les deux premières étapes vont conduire à la production de coenzymes réduits NADH₂ et FADH₂, qui vont être oxydés dans la 3ème étape par la chaîne respiratoire, aboutissant à la production d'ATP.

Dans ce manuscrit nous décrierons uniquement les étapes qui prennent place dans la mitochondrie.

- **Production d'Acétyl-CoA**

En présence d'oxygène, le pyruvate (issu du glucose) et les acylcarnitines (issus des AG) sont transformés en acétyl-CoA, substrat de la phosphorylation oxydative. Dans la mitochondrie, le pyruvate est oxydé et décarboxylé en acétyl-CoA par la pyruvate déshydrogénase (PDH). Le processus de transformation des acylcarnitines (issus des AG) est un processus plus complexe en 4 étapes, appelée la β -oxydation. La première étape est une déshydrogénation de l'acyl-CoA par l'acyl-CoA Déshydrogénase. Cette étape réduit le coenzyme FAD en FADH₂. Ensuite, le trans- Δ^2 -énoyl-CoA, ainsi formé est hydraté par la L- β -hydroxyacyl-CoA déshydrogénase, puis l'oxydation en β -cétoacyl-CoA est à nouveau associée à la production d'un coenzyme réduit, le NADH₂. Enfin, l'Acétyl-CoA est obtenu suite à une réaction de thiolysse catalysée par l'Acétyl-CoA Acyl-transférase (**Figure 10**).

L'acétyl-CoA ainsi issu de la dégradation du glucose ou des acides gras entre dans le cycle de Krebs comme principal substrat à différentes étapes.

- **Le cycle de Krebs**

Il comporte 8 réactions enzymatiques au cours desquelles une molécule d'acétyl-CoA réagit avec une molécule d'oxaloacétate pour former du citrate et des coenzymes réduits (NADH₂ et FADH₂). La première réaction est la condensation de l'acétyl-CoA avec l'oxaloacétate par la citrate synthase. Le citrate ainsi formé est déshydraté par l'aconitase en présence de Fe²⁺, formant un composé intermédiaire, le cis-aconitate,

réhydraté en isocitrate. L'action de l'isocitrate déshydrogénase conduit à la formation de NADH_2 et de l' α -cétoglutarate ensuite décarboxylé et déshydrogéné en succinyl-CoA par le complexe enzymatique α -cétoglutarate-déshydrogénase avec formation de FADH_2 . Une molécule d'ATP est alors formée lors de la transformation du succinyl en succinate par la succinyl-CoA synthétase. Le succinate est transformé en fumarate par la succinate déshydrogénase appartenant au complexe II de la chaîne respiratoire. Le fumarate est hydrolysé en malate, déshydrogéné en oxaloacétate avec production de NADH_2 .

Le NADH_2 et FADH_2 formés au cours de la β -oxydation des AG et du cycle de Krebs vont alimenter respectivement les complexes I et II de la chaîne respiratoire mitochondriale aboutissant à la production d'ATP (**figure 10**).

- **La chaîne respiratoire mitochondriale**

Le métabolisme aérobie intervient en présence d'oxygène et utilise comme substrat les lipides et les glucides. La chaîne respiratoire mitochondriale utilise l'énergie des coenzymes réduits FADH_2 et NADH_2 , par le transport d'électrons à travers 4 complexes protéiques. Ces réactions d'oxydoréduction aboutissent à la formation d'un gradient de protons dans le compartiment intermembranaire mitochondrial. L'imperméabilité de la membrane interne des mitochondries aux ions et la pression du gradient obligent les protons de l'espace inter membranaire à retourner dans la matrice en utilisant le canal formé par le complexe V-ATPase. Ainsi, ils fournissent l'énergie nécessaire à la phosphorylation de l'ADP pour former de l'ATP (voir **figure 10**).

Comme le montre la **figure 10**, les complexes protéiques sont ancrés dans la membrane interne de la mitochondrie alors que le coenzyme Q et le cytochrome C transportent les électrons d'un complexe à l'autre. Les 5 complexes ont une activité enzymatique: NADH-coenzyme Q oxydoréductase pour le complexe I, succinate-coenzyme Q oxydoréductase pour le complexe II, Coenzyme Q-cytochrome C oxydoréductase pour le complexe III, cytochrome C oxydase pour le complexe IV et ATPase pour le complexe V.

Il existe une voie alternative pour que les protons rejoignent la matrice mitochondriale: les protéines découplantes UCP (*un coupling protein*). Elles forment des canaux laissant passer les protons sous forme de chaleur, diminution ainsi le rendement

de la production d'ATP par l'ATPase. Au niveau musculaire, on retrouve majoritairement UCP2 et UCP3. Une étude a montré que son expression protéique est plus importante dans les muscles glycolytiques qu'oxydatifs [78], l'associant ainsi à une production d'ATP moins efficace.

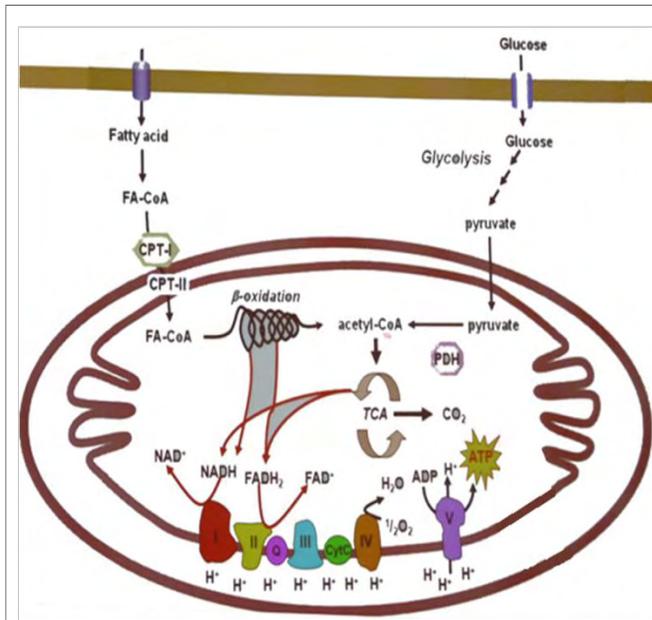


Figure 10: Métabolisme du glucose et des AG par la mitochondrie.

Le glucose et les AG sont transformés en pyruvate et acylcarnitine dans le cytoplasme puis transportés dans la mitochondrie. Les deux substrats sont ensuite transformés en Acétyl-CoA. Cette étape est dépendante de la β oxydation pour les acylcarnitines. L'Acétyl-CoA ainsi formé est pris en charge par le Cycle de Krebs par 8 réactions enzymatiques. Les coenzymes réduits NADH₂ et FADH₂ issus de la β oxydation et du TCA sont oxydés par les complexe I et II de la chaîne respiratoire mitochondriale permettant le transport d'électrons à travers la membrane interne de la mitochondrie. Ce processus crée un gradient électrochimique de protons H⁺, qui regagnent la matrice mitochondriale par l'ATP synthase. Cette étape permet la phosphorylation d'une molécule d'ADP en ATP.

2/ Les altérations mitochondriales au cours du vieillissement

a. Les modifications quantitatives

Les études concernant les variations quantitatives des mitochondries dans le muscle squelettique avec l'âge ne sont pas clairement établies. En effet, Kerner et ses collaborateurs concluent à une diminution du contenu mitochondrial dans les muscles de rats âgés [79]. En revanche, Callaghan et Gouspillou ne voient pas de différence chez des sujets âgés, indépendamment de leur sexe et de la sous-population de mitochondries étudiées (SS ou IMF) [80].

Cependant, compte tenu des propriétés dynamiques des mitochondries, les premières divergences se retrouvent dans la définition de la quantité de mitochondrie observée. En effet, certains entendent que le contenu en mitochondrie est reflété par le nombre de mitochondries, d'autres par le volume total qu'elles représentent, prenant ainsi en compte le dynamisme des mitochondries. Au cours du vieillissement, on observe un dynamisme mitochondrial en faveur de la fusion, ce qui génère des

mitochondries de grande taille et réduit leurs nombre. Dans ce contexte précis, l'étude du volume ou du nombre des mitochondries conduira à des conclusions opposées. Les différentes approches utilisées permettent cependant d'être plus précis et d'évaluer des paramètres fonctionnels de la mitochondrie comme l'activité des enzymes mitochondriales (la citrate synthase du cycle de Krebs ou la cytochrome oxydase retrouvée au niveau du complexe IV de la chaîne respiratoire), la quantité de protéine mitochondriales (comme les porines qui transportent des électrons), le nombre de copies de l'ADN mitochondrial ou la quantification du volume des mitochondries par microscopie électronique (ME).

En plus d'un impact direct de l'âge sur le contenu mitochondrial du muscle squelettique, le vieillissement va aussi agir sur la capacité à activer la biogénèse mitochondriale (mesurée par l'activité Citrate Synthase et l'expression génique de PGC1 α). En effet, il a pu être observé une diminution de la réponse mitochondriogénique au cours d'un exercice physique chez l'homme [81]. Ces altérations semblent être consécutives à une diminution des capacités d'activation du facteur de transcription PGC1 α impliqué dans la régulation positive de la biogénèse mitochondriale ainsi qu'à une dégradation augmentée des protéines des précurseurs des voies d'import mitochondriales telles que Tim23 et Hsp60 [82].

3/ Conséquences des altérations mitochondriales sur la cellule musculaire au cours du vieillissement

a. Les modifications qualitatives des mitochondries

Comme nous l'avons déjà évoqué, le vieillissement musculaire est étroitement associé à une diminution de la production d'ATP par le muscle squelettique. Plusieurs aspects du vieillissement peuvent expliquer ce phénomène.

La consommation d'ATP consécutive à un exercice physique entraîne une diminution intracellulaire des taux du second messager. Ceci va avoir pour conséquence d'augmenter la phosphorylation oxydative afin de produire de nouvelles molécules d'ATP. Ainsi, l'affinité de la phosphorylation oxydative pour l'ADP reflète les capacités de la mitochondrie à répondre à un besoin en ATP. Or, une équipe québécoise a récemment montré que cette affinité était diminuée chez les rats âgés

[83]. Ceci se traduit par une altération de la capacité de la mitochondrie à répondre à un besoin en ATP, conduisant nécessairement à la diminution de la production de cette molécule [83].

De plus, au cours du vieillissement du muscle, certaines études montrent que la fonction de la chaîne respiratoire pourrait être altérée et que cela est retrouvé chez différentes espèces comme les rongeurs, les chiens ou chez les humains. Parmi les tissus étudiés comme le cœur et le foie, les mitochondries du muscle squelettique apparaissent être les plus touchées par le vieillissement avec une forte diminution de l'activité des complexes I et IV de chaîne respiratoire chez les rats et des chiens âgés [84]. Dans une cohorte mixte de sujets de plus 73 ans, le vieillissement a été associé à une diminution des capacités oxydatives des muscles [85]. Enfin, comme précédemment mentionné, le vieillissement est associé chez la souris à une diminution de la respiration et à une augmentation de la production d'ERO tous deux conduisant à une augmentation de la sensibilité à l'apoptose [76]. Cependant, il est intéressant de noter que certaines études, majoritairement conduites chez l'homme, insistent au contraire sur le fait que le fonctionnement de la mitochondrie au cours du vieillissement peut rester intact et comparable à des individus plus jeunes [86]. Dans ce sens, l'équipe de Russel Hepple a comparé deux cohortes de personnes âgées actives ou sédentaires [80]. Le but de cette étude étant de distinguer les effets du vieillissement et de la sédentarité chez les personnes âgées. Les auteurs ont pu mettre en évidence que les personnes âgées actives présentaient une perte de masse musculaire, mais que celle-ci ne s'expliquait pas par une altération de la chaîne respiratoire, qui est inchangée lorsque elle est comparée à des individus plus jeunes, alors qu'elle est défectueuse chez les individus âgés sédentaires. Ces résultats suggèrent que la qualité de la chaîne respiratoire mitochondriale semble être dépendante de l'activité physique plus que du vieillissement intrinsèque, et n'est probablement pas directement la cause de l'atrophie musculaire associée à l'âge [80]. Dans les différentes études menées sur l'évolution de la fonction mitochondriale avec l'âge, de nombreuses approches différentes ont été utilisées, apportant un biais dans la comparaison des résultats tel que le matériel biologique utilisé pour évaluer la respiration mitochondriale : mitochondrie, fibres ou muscles isolés. Cependant, ces divergences pourraient souligner la limite des modèles animaux dans l'étude du vieillissement, qui ne reflètent pas l'hétérogénéité du mode de

vie des personnes âgées qui peuvent amener à des résultats contradictoires, comme le suggère l'étude de Gousspillou et al.

b. Altération de l'utilisation des substrats énergétiques

Le vieillissement du muscle squelettique est marqué par le développement plus ou moins marqué selon les individus d'une résistance à l'insuline. En se fixant sur son récepteur à la surface des cellules musculaires, l'insuline induit la translocation des transporteurs du glucose (les GLUT pour Glucose Transporteur Type), qui permet l'entrée de glucose dans le cytoplasme et oriente le métabolisme vers la glycolyse. Nous n'aborderons pas en détail les mécanismes conduisant à cette insulino-résistance, cependant, les travaux de Shulman rapportent que le déclin de la phosphorylation oxydative de la mitochondrie avec l'âge, serait responsable de l'accumulation d'acides gras dans le muscle qui participent à l'insulino-résistance [87]. Ainsi, l'utilisation préférentielle des glucides ou des lipides par l'organisme (qui est estimée par le ratio entre l'O₂ consommé et le CO₂ produit par les tissus) révèle, chez la personne âgée, une utilisation préférentielle de glucides à l'échelle de l'organisme entier [87]. Cette observation peut être mise en relation avec l'accumulation de lipides non métabolisés dans le muscle squelettique comme cité précédemment. Cependant, en septembre 2015, l'équipe de G. Shulman publie une nouvelle méthode permettant d'évaluer le type de substrat consommé à l'échelle de la mitochondrie [87]. Contrairement aux résultats obtenus lors de la mesure du quotient respiratoire, ces nouveaux travaux montrent que la mitochondrie du muscle squelettique des sujets âgés présente la même efficacité pour gérer les flux métaboliques lipidiques que les sujets jeunes. En revanche, en réponse à une stimulation par l'insuline, les mitochondries « âgées » ne sont pas capables de passer de l'oxydation des lipides vers celle des glucides comme le font les mitochondries des sujets jeunes démontrant une perte de la **flexibilité métabolique** au cours du vieillissement. Ces résultats mettent en jeu l'altération du dynamisme métabolique entre l'utilisation des lipides et des glucides et souligne l'incapacité des cellules musculaires à s'adapter à l'environnement [88].

Flexibilité métabolique: L'organisme nécessite une bonne capacité d'adaptation aux variations d'apports et de dépenses énergétiques. Cette adaptabilité requiert la permutation entre les lipides et les glucides comme substrats aussi bien au repos qu'à l'exercice.

c. Production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO)

Le transfert d'électrons de la chaîne respiratoire mitochondriale est associé à la réduction du dioxygène (O_2) en anion superoxyde (O_2°) (majoritairement au niveau des complexes I et III), qui peut réagir avec du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) formant un radical hydroxyle (OH°) hautement réactif. Ces 3 produits sont délétères et peuvent oxyder des composés cellulaires tels que les lipides de la membrane plasmique, les protéines et les acides nucléiques de l'ADN, créant des mutations de l'ADN mitochondrial et/ou nucléaire. L'oxydation est extrêmement délétère pour la cellule puisqu'elle entraîne la perte de fluidité des membranes plasmiques (peroxydation des lipides membranaires) ainsi qu'une modification des charges à leur surface. Ces événements entraînent l'inactivation des enzymes membranaires et augmentent la perméabilité des mitochondries [89]. Ceci aura pour conséquence une altération de la chaîne respiratoire mitochondriale et conduira à l'apoptose de la cellule musculaire notamment.

En plus de l'ADN et des lipides, les ERO peuvent cibler les protéines des canaux calciques du réticulum sarcoplasmique (RE du muscle squelettique) ce qui nuit aux mouvements de calcium dans le cytoplasme qui est un élément clé de la contraction musculaire [89]. Les ERO vont également avoir un rôle important dans l'altération des protéines du RE observée au cours du vieillissement musculaire. La conséquence de cette action délétère sera une augmentation du stress du RE mal maîtrisée à l'échelle de la cellule. En effet, les ERO ciblant également les systèmes de protection protéiques comme les protéines chaperonnes à l'origine de la régulation de la réponse au stress du RE, la réparation des protéines ne pourra pas se faire et entraînera un cercle vicieux augmentant le stress oxydant et donc la génération de nouvelles ERO. Ainsi, une étude a pu montrer que dans le muscle de rats âgés de 32 mois, les chaperonnes Hsp 70, CHOP et GPR78 apparaissaient diminuées par rapport aux jeunes rats et que cette altération était imputable aux ERO [90]. Ce cercle vicieux aboutira, *in fine*, à la dégradation de protéines structurales des fibres musculaires en bon état favorisant la désorganisation de la cellule et conduisant à son apoptose, à l'origine de la diminution de la masse musculaire liée à l'âge.

L'excès d'ERO active également des mécanismes physiologiques compensatoires de défenses anti-oxydantes des cellules telles que l'activation des

enzymes comme la SuperOxyde Dismutase (SOD), qui permet la dismutation de l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène. Le peroxyde d'hydrogène sera alors pris en charge par la catalase et certaines peroxydases pour former à nouveau de l'O₂ et de l'eau. Il existe également des antioxydants non enzymatiques que l'on trouve dans l'alimentation tels que les polyphénols comme le resveratrol présent dans le vin et le raisin, connus pour augmenter la durée de vie (voir chapitre Traitements).

Au cours du vieillissement, le muscle squelettique présente une augmentation de l'activité des enzymes anti-oxydantes (les SOD 1 et 2, la catalase), stimulées par la présence d'ERO en grande quantité chez l'homme et les cochons âgés [91] [92]. Ce phénomène montre bien qu'il existe un déséquilibre du statut redox puisque les défenses anti-oxydantes ne parviennent pas à prévenir les altérations cellulaires induites par les ERO [93].

d. Perméabilité du pore mPTP

La mitochondrie est composée d'une membrane externe très peu perméable qui, dans certaines conditions, se perméabilise de façon transitoire sous l'effet de concentrations en calcium élevées ou par stimulation des ERO [94]. Cette perméabilité est permise par un pore, appelé **mégapore de transition de perméabilité mitochondriale** (mPTP) et donne aux mitochondries un aspect gonflé (*swelled* en anglais). La perméabilité du pore entre l'espace inter-membranaire et la matrice n'est pas sélectif et laisse passer l'eau et les molécules inférieures à 1,5 kDa, ce qui expose la mitochondrie à une libération dans le cytoplasme du cytochrome C et AIF, molécules en partie à l'origine de l'apoptose. Le sujet âgé en bonne santé développant une atrophie musculaire présente une altération de la sensibilité du mPTP rendant la mitochondrie plus sensible à l'apoptose accompagnée d'une augmentation de substances apoptogènes dans le cytosol [80].

e. Sensibilité de la cellule musculaire à l'apoptose

La mitochondrie est un acteur central de l'apoptose dite « myonucléaire » (défini dans le chapitre suivant), des fibres musculaires. Un événement clé qui déclenche la mort cellulaire programmée est la perméabilité de la membrane externe de la

mitochondrie (OMMP pour *Outer mitochondrial membrane permeability*). Cette perméabilité est régulée par la balance entre les protéines pro-apoptotiques (Bax, Bak et Bid) et anti-apoptotiques (Bcl2 et Bcl X_L). Par ailleurs, l'ouverture du pore de transition de la perméabilité (mPTP) interrompt la membrane externe de la mitochondrie et déclenche également l'OMMP. A partir de cette étape, il existe deux voies apoptotiques, dépendantes ou non des caspases (*cysteine-dependent, aspartate-specific proteases*). L'activation de la libération des facteurs apoptotiques (cytochrome c et AIF/EndoG) comme décrit précédemment, dépend de la perméabilité de la membrane externe de la mitochondrie dont l'intégrité est préservée par un équilibre entre les facteurs pro et anti-apoptotiques (Bcl2, Bax, ...) ainsi que la perméabilité du pore de transition (mPTP). Les altérations mitochondriales, observées au cours du vieillissement et associées à une sensibilité accrue à l'apoptose, contribuent activement à l'atrophie musculaire comme le montre Chabi et ses collaborateurs [76]. Il apparaît une augmentation des deux voies de l'apoptose, bien que la voie caspase-indépendante semble plus affectée, ainsi qu'une régulation spécifique à un type de muscle. En effet, la protéine pro-apoptotique Bax est augmentée dans les muscles à contraction rapide (*Extensor Digitorum Longus*) sans modification dans les muscles lents comme le *soleus*. Au contraire, la protéine Bcl2 est augmentée dans les différents types de muscles, résultant d'un processus de compensation. Cependant, la phosphorylation inactivatrice de Bcl2 mise en évidence dans ces conditions annulerait son effet anti-apoptotique [76].

4/ Les régulations impliquées dans les dysfonctions mitochondriales au cours du vieillissement.

Comme nous l'avons déjà évoqué plus haut, PGC-1 α , un coactivateur de la transcription, est le régulateur principal de la biogénèse et de la fonction des mitochondries. Comme son rôle sur la régulation de leur synthèse a déjà été décrit dans le chapitre correspondant, nous allons cibler notre intérêt sur la régulation de la fonction mitochondriale.

N'ayant pas la capacité de se lier à des séquences d'ADN, PGC-1 α interagit directement ou coactive de nombreux facteurs de transcriptions autres tels que les NRFs, les PPARs et ERR α et γ (*Estrogen-related receptors*).

Les **EER**, des récepteurs orphelins, stimulent la transcription de gènes nucléaires impliqués dans la biogénèse et la régulation des capacités oxydatives de la mitochondrie [95]. Bien que surexprimant PGC1 α , des cellules fibroblastiques issues de souris déficientes en ERR α , ne montrent pas d'induction de l'expression de gènes impliqués dans la fonction mitochondriale comme CPT-1 (transporteurs des acylcarnitines), le Cytochrome C (transporteur d'électrons entre les complexe III et IV de la chaîne respiratoire), la SOD (enzyme antioxydante) ou encore la citrate synthase (enzyme du cycle de Krebs) contrairement aux cellules de souris surexprimant PGC1- α sans modification d'ERR α [95]. Plus particulièrement dans le muscle squelettique, l'interaction entre PGC-1 et ERR stimule la production de Perm1 (pour *PGC-1 α and ERR induced regulator in muscle 1*) spécifique du muscle squelettique et régulateur des capacités oxydatives du muscle squelettique [95].

Les **PPAR α** et γ et δ (pour *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor*) sont des récepteurs nucléaires qui se comportent comme des facteurs de transcription, régulant l'expression de nombreux gènes impliqués dans le métabolisme des acides gras *via* la stimulation des capacités oxydatives de la mitochondrie. La surexpression génétique de PPAR α ou δ conduit à une utilisation des lipides augmentée et à une meilleure β oxydation dans le muscle strié squelettique (**figure 11**) [96].

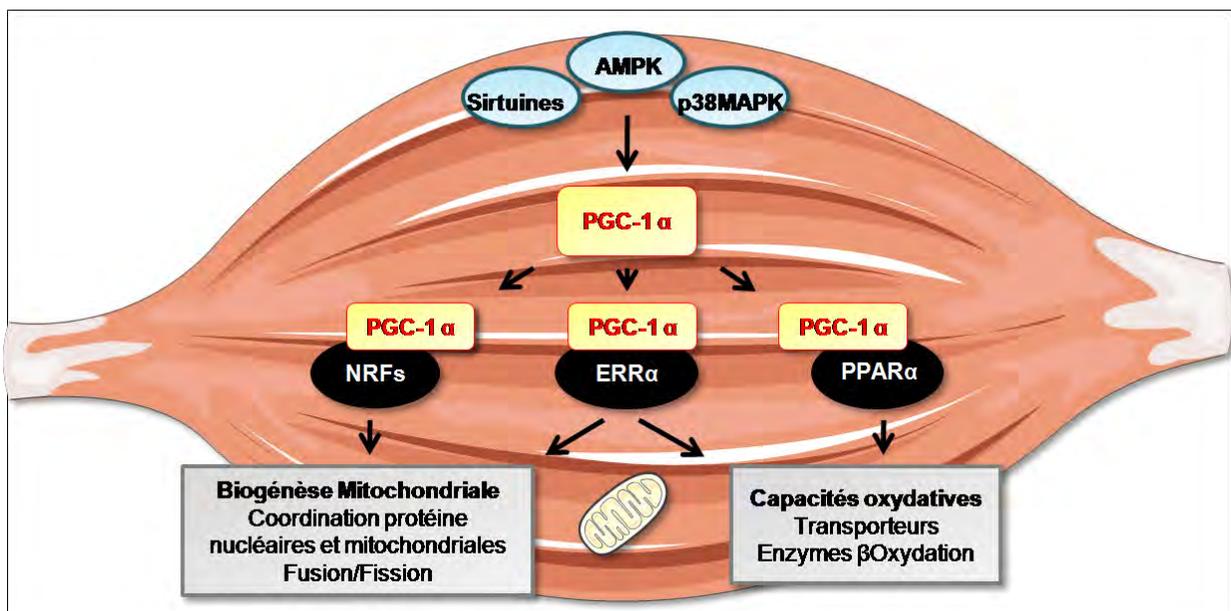


Figure 11 : Cascade de régulation de PGC-1 α dans le muscle squelettique.

L'activation de PGC1 α , par les sirtuines, l'AMPK et la p38MAPK entraîne son interaction avec les NRFs et ERR α , induisant la transcription de gènes impliqués dans la biogénèse mitochondriale comme les transporteurs des protéines nucléaires et les facteurs responsables des phénomènes de fusion et de fission. L'activation des ERR α et de PPAR α , conduit à la régulation de la transcription de gènes impliqués dans la fonction mitochondriale, comme les enzymes de la β oxydation et les transporteurs d'électrons de la chaîne respiratoire.

L'activité de PGC-1 α peut être modulée par différents événements post-traductionnels parmi lesquels on retrouve la phosphorylation par p38MAPK et l'AMPK ou l'acétylation par les sirtuines [65]. Il est intéressant de noter que les 3 situations sont induites par un exercice physique, ce qui soutient l'importance de l'activité physique chez les sujets âgés pour prévenir la diminution de l'activation de PGC-1 α [99] [100].

La **p38 MAPK** (*P38 Mitogen-Activated Protein Kinase*) est une enzyme qui active les voies de signalisation de réponse au stress comme l'exercice physique, l'exposition aux ultra-violets ou les cytokines inflammatoires. Dans le muscle squelettique, son activité est nécessaire à la différenciation de cellules musculaires [101] et joue un rôle important dans le métabolisme du glucose et la dépense énergétique. L'équipe de B. Spiegelman a montré dans le muscle que la phosphorylation de PGC-1 α par la p38 MAPK stabilisait la quantité protéique de PGC-1 α et augmentait par conséquent la respiration mitochondriale [102].

La famille des **sirtuines** (*Silent Information Regulator*) est constituée de 7 désacétylases d'histone NAD-dépendantes présentes dans le cytoplasme (Sirt-2), le noyau (Sirt-1, 6 et 7) ou la mitochondrie (Sirt-3, 4 et 5) des cellules procaryotes et eucaryotes [103]. Bien que ces enzymes soient considérées comme étant impliquées dans les processus de vieillissement par leur lien étroit avec le stress oxydatif, seules les sirtuines 1 (la plus étudiée) et 3 ont été reliées au vieillissement musculaire [104] [105].

En effet, l'inhibition génétique de l'expression de la sirtuine 1 entraîne une accélération du vieillissement des souris (augmentation de la sénescence, affinement de la peau, diminution des capacités de divisions cellulaires, etc...) et une diminution de la longévité [105]. Son invalidation spécifiquement musculaire chez la souris est associée à la diminution de la quantité et de la qualité des mitochondries [106]. De plus, avec l'âge, son activité est altérée en réponse à un exercice physique, ce qui semble participer à la difficulté des cellules musculaires à s'adapter à ce stress (**figure 11**) [107].

Les protéines AMPK, p38 MAPK et la sirtuine 1 étant sensibles au stress oxydant, leur activité est altérée par la présence d'ERO dans le muscle squelettique, bien que seule l'expression protéique AMPK apparaisse diminuée chez le rat âgé [108].

C] Modification de la répartition des fibres musculaires

1/ Les différents types de fibres

Selon le mode de contraction d'un muscle, les fibres musculaires le composant auront un fonctionnement adapté à sa fonction. Ainsi, les propriétés contractiles d'un muscle sont déterminées par le type de fibre musculaire qui le compose.

Les fibres exprimant les chaînes lourdes de **myosine de type I** sont riches en mitochondries, elles utilisent préférentiellement des lipides. Ce sont les fibres dont le diamètre est le plus petit, et leur couleur est la plus rouge, du fait leur richesse en myoglobine, protéine transportant l'O₂, nécessaire à leur métabolisme aérobie associé à une forte activité ATPasique. La contraction de ces fibres est lente, d'intensité faible mais elles sont capables de soutenir une contraction durant une longue période.

Les fibres musculaires exprimant les chaînes lourdes de **myosine de type II** contiennent moins de mitochondrie. Elles utilisent préférentiellement le glucose comme substrat énergétique. Par conséquent, leur métabolisme est majoritairement anaérobie et il nécessite peu d'O₂. Leur contenu en hémoglobine est donc faible et leur couleur apparaît plus claire que les fibres de type I. De plus, leur diamètre est plus important. Elles se contractent avec une forte intensité mais uniquement durant les premières phases d'un exercice, le relais étant pris ensuite par la contraction des fibres de type I. La contraction rapide de ce type de fibres nécessite des mouvements de calcium intra cellulaire très rapide qui se caractérisent par un réticulum sarcoplasmique extrêmement développé. Parmi les fibres de type II, on distingue les **Ila** des **Ilb/x** selon leur potentiel oxydatif. En effet, les fibres de types **Ilb/x** sont beaucoup plus glycolytiques que les types **Ila**, qui ont un phénotype intermédiaire entre les I et les **Ilb/x**. Les propriétés des différentes fibres sont récapitulées dans le tableau de la **figure 12**.

Ainsi, les muscles posturaux comme ceux du cou et du dos auront une majorité de fibres de type I, tandis que les muscles mobiles comme ceux des bras ou des yeux auront une majorité de fibre de type II et plus précisément de type **Ilb/x**. Enfin, il faut noter que si les muscles présentent une prépondérance pour un type de fibre, il n'existe pas de muscle exprimant exclusivement un type de fibres comme le montre la **figure 12b**.

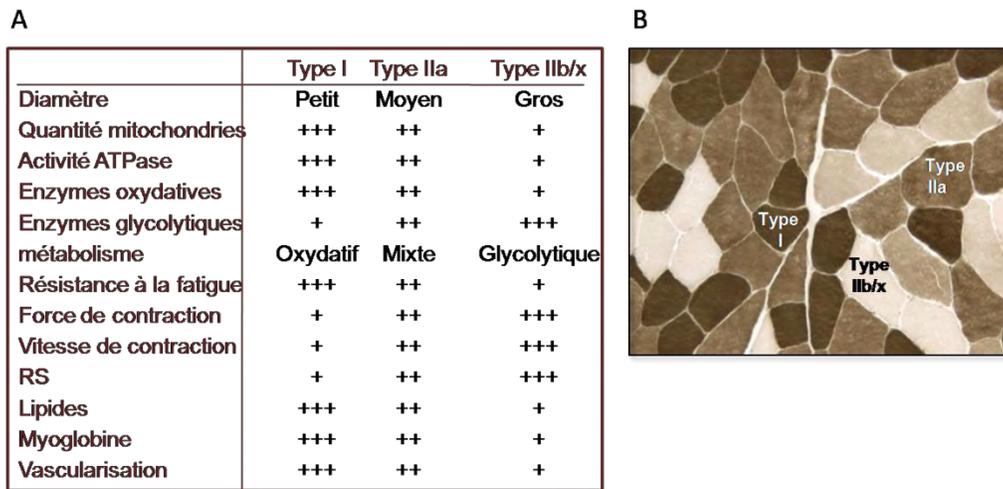


Figure 12 : Typologie du muscle squelettique.

A. Récapitulatif de la structure et des propriétés moléculaires des différents types de fibres composant un muscle strié squelettique. **B.** Photo histologique d'une coupe transversale de muscle. La mise en évidence de l'activité ATPase montre la mosaïque de répartition de fibres musculaires. Plus l'activité est importante, plus la fibre est foncée. Ce type d'expérience permet de différencier les fibres de type I avec une forte activité ATPasique, des fibres de type IIa ayant une activité ATPasique intermédiaire et des fibres IIb/x, qui apparaissent presque blanches, témoin d'une très faible activité ATPasique.

2/ Répartitions des fibres au sein d'un muscle et influence du vieillissement

La répartition des fibres au sein d'un muscle est un processus dynamique qui montre une grande capacité d'adaptation des fibres musculaires et souligne leur propriété de plasticité. La mosaïque des fibres est déterminée par leur sollicitation. Prenons l'exemple d'un individu qui s'entraînerait pour un marathon, on observerait au niveau de son quadriceps (groupe de muscles glycolytiques) un changement des fibres de type IIb/x vers un phénotype I et IIa, entraînés par l'entraînement d'endurance. Au contraire un individu qui s'entraînerait pour de l'haltérophilie (exercice dit explosif), verrait ses fibres s'orienter vers un phénotype majoritaire IIb/x.

Si la compréhension de la typologie musculaire est importante dans ce manuscrit, c'est en raison de sa modification au cours du vieillissement et de l'implication de la mitochondrie dans ces changements. En effet, **on observe dans les muscles de patients âgés, un changement des fibres de type II vers des fibres de type I.** On peut distinguer à ce jour deux mécanismes responsables de ce changement. Tout d'abord, une altération de l'innervation qui conduit à la transformation d'une fibre de type I en fibre de type II, dont les mécanismes sont décrits dans le chapitre correspondant. Ensuite, les fibres de type II sont plus sensibles au vieillissement et, bien

que les mécanismes restent à déterminer, elles sont plus sensibles à la mort cellulaire. L'équipe de Spiegelman a montré en 2002, que la stimulation de PGC1 α dans le muscle de souris, entraînait une orientation des fibres vers un type I [109, p. 1]. Dans ce sens, un rôle protecteur de PGC1 α a été suggéré pour expliquer la meilleure résistance des fibres de type I face au vieillissement [110].

D] Diminution du renouvellement cellulaire

1/ Apoptose

a. Les voies de l'apoptose

L'apoptose est un processus physiologique très conservé de mort cellulaire autoprogrammée des cellules sans inflammation ni atteinte des cellules voisines [111]. Cet événement, nécessaire à l'élimination de cellules altérées, participe au bon fonctionnement du tissu. Les cellules musculaires sont plurinucléées et l'apoptose d'un noyau entraîne uniquement la dégradation de la membrane qui l'entoure (appelée sarcoplasme), sans pour autant démanteler la cellule entière. Dans ce contexte, la mitochondrie est considérée comme l'acteur clef de la signalisation et de l'initiation de l'apoptose par une voie dépendante des caspases et une voie indépendante. En effet, comme le montre la **figure 13**, la libération dans le cytosol du cytochrome c qui se lie à l'Apaf-1 (*protease-activating factor-1*), à l'ATP et à la procaspase-9 forment un complexe appelé l'apoptosome. Ce complexe amorce la cascade des caspases qui sont normalement sous la forme inactive cytosolique de pro-caspases. La cascade est déclenchée par l'activation des caspases d'initiation, caspases 8, 9 et 12. L'activation des caspases effectrices 3 et 6 participe aussi à la dégradation protéique ainsi qu'à la fragmentation de l'ADN *via* l'activation de la DNase CAD (*caspase-activated Dnase*). Indépendamment des caspases, la libération de l'AIF (*apoptosis-inducing factor*) et de l'endonucléase G (Endo-G) peuvent, tous les deux, directement être transférés au noyau pour fragmenter l'ADN. Ces différents mécanismes sont schématisés dans la **figure 13**.

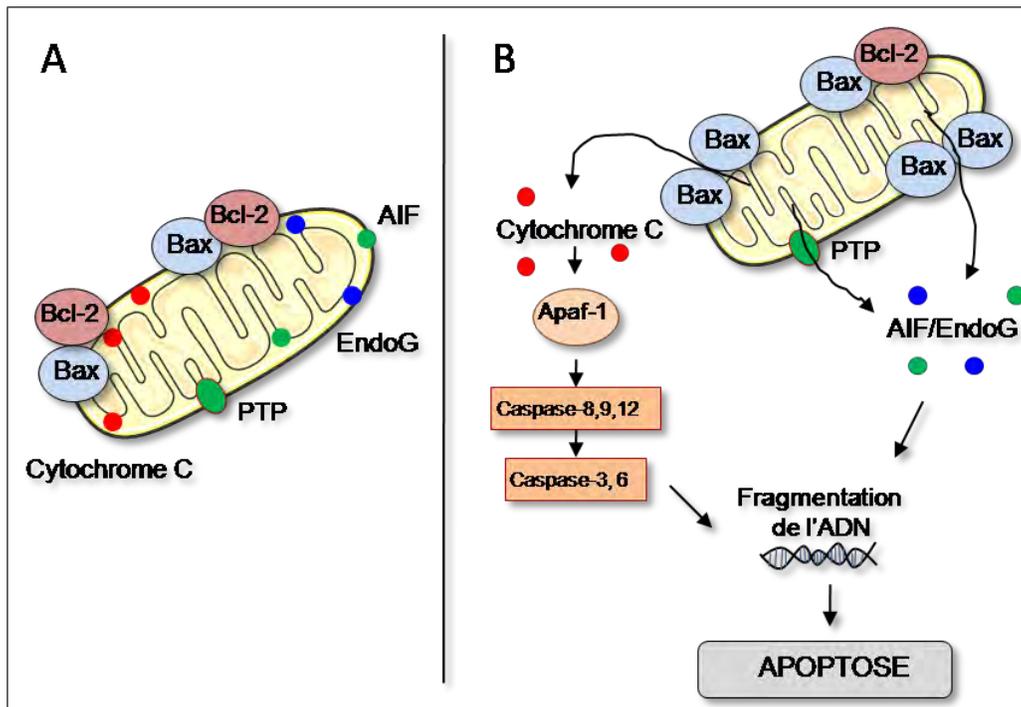


Figure 13 : Les voies de l'apoptose.

A : Dans les conditions normales, Bcl-2 (anti-apoptotique) interagit avec Bax (pro-apoptotique). Les substances apoptogènes (Cytochrome C, EndoG et AIF) sont séquestrées dans la mitochondrie. **B** : Lorsque le ratio Bcl-2/Bax diminue, des protéines Bax se retrouvent libres et s'homodimérisent pour former un pore au niveau de la membrane externe de la mitochondrie laissant s'échapper les substances apoptogènes dans le cytoplasme. L'augmentation des ERO au cours du vieillissement participe à la détérioration du pore PTP, entraînant la perméabilisation de la membrane externe de la mitochondrie et laissant également traverser les substances apoptogènes. Une fois dans le cytoplasme, le cytochrome C active la voie de l'apoptose dépendante des caspases en stimulant les caspases initiatrices (8, 9 et 12), puis les caspases effectrices (3 et 6). La voie indépendante des caspases fait intervenir AIF et l'EndoG. Les deux voies conduisent à la fragmentation de l'ADN et la dégradation protéique au cours de l'apoptose.

b. Régulation au cours du vieillissement

Il est accordé que l'apoptose de cellules post-mitotiques comme les neurones ou les fibres musculaires participe à la perte de fonction et le masse du tissu [112]. Au sein du muscle squelettique, la fragmentation de l'ADN, témoin de l'apoptose, augmente au cours de l'âge parallèlement au développement de la sarcopénie. Plus précisément, on observe, chez le rongeur âgé, une augmentation des marqueurs de l'apoptose impliqués dans les voies dépendantes et indépendantes des caspases comme l'augmentation cytosolique du cytochrome C, AIF, EndoG, la caspase-9 ou Bcl-2 [113].

2/ Sénescence

La sénescence a été observée pour la première fois par Leonard Hayflick en 1961, lorsqu'il a remarqué que des fibroblastes en culture avaient un nombre de divisions cellulaires limité avant d'être bloquées au cours d'un plateau d'arrêt de croissance. Les recherches qui ont suivi ont mené à la découverte des télomères, séquences non codantes qui prolongent les chromosomes. A chaque division cellulaire, les extrémités de l'ADN ne peuvent pas être répliquées, les télomères se raccourcissent et permettent de conserver les séquences d'ADN codantes intactes. Cependant, les télomères raccourcissent avec l'âge jusqu'à une taille seuil qui entraîne l'arrêt du cycle de la cellule et la fait entrer dans une phase appelée sénescence [114].

La présence de cellules sénescents ne s'apparente pas seulement à la longueur des télomères mais également à l'influence de facteurs externes qui génèrent un stress cellulaire tels que les rayonnements ultra-violet, les radicaux libres, l'exposition à des molécules chimiques ou encore une stimulation mitogénique puissante. Ces différents paramètres conduisent à l'arrêt du cycle cellulaire, typiquement dans un stade de quiescence, bien qu'à l'inverse des cellules quiescentes, les cellules sénescents soient en arrêt définitif de leur réplication et ce même sous l'effet de facteur de différenciation [114]. Les deux voies principales conduisant à l'arrêt du cycle sont dépendantes de p53 et p16.

P53 est un facteur de transcription très peu présent dans une cellule normale, mais suite à une stimulation, son activation et la transcription d'un panel de gènes cibles va mener soit à l'arrêt du cycle de la cellule soit à son apoptose. L'arrêt du cycle permet de réparer les dysfonctionnements cellulaires qui ont conduit à l'activation de p53, si la cellule n'est pas apte à reprendre son cycle cellulaire, les taux de p53 ne vont pas diminuer, ce qui conduira à l'augmentation de la protéine BAX, pro-apoptique. P16, aussi connue sous le nom de *cyclin-dependent kinase inhibitor 2A*, est un suppresseur de tumeur qui freine la transition de la phase G1 (quiescente) à la phase S (duplication)

Sénescence : Lorsque les cellules ne sont plus capables de se diviser sans perdre une partie de leur information génétique (parce que les télomères ont atteints leur taille minimale), elles rentrent dans un état d'arrêt du cycle qui est appelé sénescence. Bien qu'elles ne puissent plus se répliquer, elles restent métaboliquement actives et adoptent un phénotype immunogène en relargant des facteurs pro-inflammatoires notamment. Ces cellules peuvent être distinguées des autres par leur forte activité β -galactosidase.

du cycle. Sa mutation a notamment été mise en évidence dans le cas de plusieurs cancers [115] [116].

P16 agit comme un suppresseur de tumeur en fixant la cycline D, ce qui empêche la formation du complexe CDK4/6-Cycline D responsable de l'activation du facteur de transcription E2F1 qui rend possible le passage de la phase G à S. Au cours du vieillissement, le nombre de cellules sénescents augmente, de même que l'expression de p16 [117]. Jusqu'à récemment, on ne faisait que soupçonner l'implication des cellules sénescents dans les altérations tissulaires associées au vieillissement imputables notamment à leur sécrétome, nocif pour les cellules environnantes. Or, l'équipe de Sharpless a mis en évidence que p16 augmentait avec le vieillissement dans la majorité des tissus, allant jusqu'à proposer son expression comme biomarqueur du vieillissement [117]. Par la suite, l'équipe de Jan M. van Deursen (Mayo Clinic, Minnesota), a mis au point un modèle murin empêchant la senescence dans lequel les cellules exprimant p16 sont éliminées sous l'induction d'un agent pharmacologique (souris BUBR1-P16INK-ATTAC). Cette étude a montré qu'il existait une relation de causalité entre les cellules sénescents et les altérations tissulaires associées au vieillissement puisque leur élimination entraîne, dans le muscle squelettique, une augmentation de la taille des fibres musculaires associée à une augmentation de la masse des muscles squelettiques. Cette intervention entraîne également une diminution de l'expression des caspases (impliquées dans l'apoptose) et augmente en parallèle les capacités physiques des animaux [118]. De plus, ces travaux mettent également en avant qu'en ciblant ces cellules, il est possible de prévenir ou de retarder ces altérations dans d'autres tissus tels que les yeux (cataracte) et le tissu adipeux [118].

3/ Régénération cellulaire

a. Mécanismes de la régénération physiologique

Les cellules souches du muscle strié squelettique, aussi appelées **cellules satellites**, sont des cellules résidentes cruciales pour la croissance et le renouvellement musculaire. Elles se situent entre la lame basale et la membrane plasmique des cellules musculaires. En situation de repos, elles sont quiescentes et identifiables par l'expression des marqueurs positifs CD34, myf5, M-cadhérine, et Pax 7, ainsi que des

marqueurs négatifs Sca-1 et MyoD à leur surface. Lors d'une agression tissulaire, les éléments libérés par les cellules en souffrance telles que des cytokines inflammatoires (IL6 et TGFβ) activent les cellules satellites, qui entrent alors dans des processus de différenciation en myoblastes et qui vont à leur tour fusionner pour former des myotubes multinucléés et enfin des fibres musculaires. Les étapes de cette différenciation sont marquées par l'expression successive de différents marqueurs. Ainsi, comme le montre la **figure 14**, les cellules satellites activées expriment les marqueurs régulations myogéniques Myf5, MyoD, Pax7, M-cadhérine.

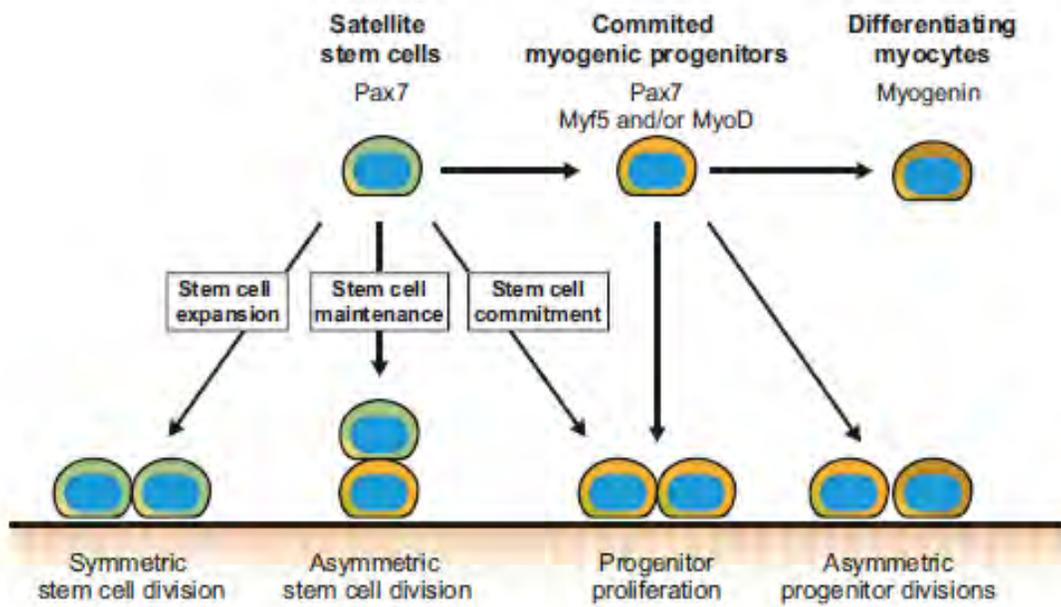


Figure 14 : Devenir des cellules satellites [120].

Les cellules satellites activées ($Pax7^+$, $Myf5^+$, $MyoD^+$) se divisent soit de façon symétrique et augmentent le pool de cellules souches, soit de façon asymétrique, maintenant le pool et produisant des progéniteurs myogéniques. Les cellules satellites peuvent aussi directement s'engager dans la différenciation myogénique et proliférer pour donner plus de progéniteurs ($Pax7^+$, $MyoD^+$ et/ou $Myf5^+$), qui fusionneront et formeront de nouvelles myofibrilles.

Ce sont des facteurs de transcriptions spécifiques du muscle qui régulent l'expression des gènes nécessaires à la différenciation comme les chaînes de myosines. Quand ils s'hétérodimérisent avec la E-protéine, ils sont capables de se fixer à l'ADN et d'initier la transcription [119]. A l'inverse, lorsque la protéine Id (*Inhibitor of Differentiation*) fixe la protéine E ou directement les MRFs, elle empêche leur fixation à l'ADN. De plus, des études récentes ont mis en évidence que cette population de cellules souche était hétérogène. En effet, après leur activation, les cellules ont deux possibilités (**figure 14**): 1) Certaines cellules satellites activées vont entreprendre une

division symétrique donnant deux cellules filles identiques, ce qui augmente le pool de cellules souches résidentes. 2) D'autres cellules enclenchent une division asymétrique permettant le maintien du pool de cellules souches et la génération de progéniteurs myogéniques.

Le principal régulateur de la quiescence des cellules satellites est la voie Notch, elle-même stimulée par FOXO3, très exprimée dans les cellules satellites non activées [121]. Au cours de la régénération, la répression de Notch, l'activation de la p38 $\alpha\beta$ MAPK (pour *Mitogen-Activated Protein Kinase*) et l'activation de la voie JNK/STAT3 sont nécessaires à la sortie des cellules du stade quiescent G0 pour s'engager dans le cycle cellulaire de la lignée myogénique [122] [123].

b. Altération de la régénération avec l'âge

Les capacités de régénération du tissu musculaire sont altérées avec l'âge. Deux causes ont été mises en évidence, la diminution du nombre de cellules satellites, ainsi que l'altération de leur fonction. La question des variations de nombres des cellules satellites au cours du temps a longtemps été controversée. Cependant, avec l'amélioration des techniques d'identification et de quantification, une diminution de l'ordre 50 % du pool de cellules satellites a pu être mise en évidence chez les sujets âgés [124]. Les causes de cet événement sont encore mal connues. Cependant, quelques éléments de réponse sont donnés par les cellules musculaires qui forment une niche maintenant l'état quiescent des cellules satellites par communication entre les deux types cellulaires. Par exemple, dans des conditions physiologiques, les fibres musculaires constituant la niche des cellules satellites exprime le facteur de croissance fibroblastique Fgf-2, qui possède une forte activité myogénique sur les cellules souches. Le maintien de l'état quiescent est en partie dû à la forte expression de Spry1 (Sprouty 1), régulateur négatif de Fgf-2. L'équipe de Brack a montré qu'avec l'âge, les fibres musculaires expriment plus de Fgf-2 et les cellules satellites moins de Spry1, les rendant plus sensible à l'action myogénique de Fgf-2 [124].

De plus, des processus affectant la survie cellulaire comme l'apoptose et la sénescence pourraient également participer à la perte des cellules souches qui, avec l'âge, présentent une dérégulation de p16(INK4a) dont la répression est nécessaire au

maintien de la quiescence [125]. L'augmentation de p16(INK4a) dans les cellules souches, les feraient passer directement d'un état quiescent à sénescence, puis à leur destruction par apoptose [125]. Les altérations de la niche ainsi que les modifications intrinsèques des cellules satellites avec l'âge apparaissent comme des facteurs émergents participant à la déplétion de ces cellules. D'autre part, le vieillissement étant également propice à l'altération de la fonction des cellules satellites, intéressons-nous aux facteurs extrinsèques et intrinsèques qui en sont responsables.

Des études de greffes tissulaires et de parabioses hétérochroniques révèlent que des facteurs dérivant du microenvironnement tissulaire et systémique, modifiés avec l'âge, affectent la fonction des cellules satellites. Ces facteurs myogéniques et circulants issus d'animaux jeunes sont capables de « rajeunir » les capacités de régénération d'animaux âgés en agissant sur leurs cellules satellites [126] [127].

Bilan : Comme le montre ce chapitre, les dysfonctions mitochondriales sont au centre des mécanismes intrinsèques favorisant la sarcopénie. Elles participent aux altérations des principales voies cellulaires : la trophicité du tissu (par la balance protéique), son intégrité (apoptose et sénescence) et sa fonction (production d'ATP par la mitochondrie).

II- MECANISMES EXTRINSEQUES FAVORISANT LA SARCOPENIE

Aux dysfonctionnements propres aux cellules musculaires vieillissantes, s'ajoutent les altérations des autres tissus de l'organisme qui modifie l'environnement du muscle squelettique. Ainsi nous considérerons comme mécanismes extrinsèques favorisant la sarcopénie, tous les événements externes à la cellule musculaire qui participe à la perte de la masse et de la fonction musculaire.

A] Innervation

Le muscle squelettique répond à une contraction volontaire contrôlée par des motoneurones α dont le corps cellulaire se situe au niveau de la corne ventrale de la moelle épinière. Chaque neurone envoie un axone qui se ramifie pour donner plusieurs terminaisons formant une synapse au niveau de chaque jonction neuromusculaire, lieu de sécrétion du neurotransmetteur acétylcholine. Ainsi, un motoneurone est responsable de la contraction de plusieurs fibres musculaires dont l'ensemble est appelée unité motrice. Un motoneurone innerve indifféremment des fibres de différents types.

Au cours du temps, les personnes âgées réalisent de moins en moins de mouvements intenses et courts, ce qui entraîne une diminution de l'innervation des fibres de type II au profit des fibres de type I. D'après certains auteurs, ces modifications de l'innervation sont, au sein d'une boucle de régulation négative, en grande partie responsables de la modification de la répartition des fibres par muscles et de la susceptibilité préférentielle des fibres de type II au cours du vieillissement. De plus, avec l'âge, une altération du remodelage des unités motrices se produit. Ainsi, les cycles dénervation/nouvelle ramification de l'axone et réinnervation au niveau des jonctions neuromusculaires sont un processus physiologique participant au renouvellement des synapses. Chez le sujet jeune, ce renouvellement ne modifie pas le type de fibre innervée ni la quantité d'innervation. Comme cité précédemment, au cours du vieillissement, on observe des modifications dans la répartition des fibres musculaires de type I et II. Nous avons déjà abordé les modifications quantitatives et nous allons voir comment l'innervation affecte l'organisation du tissu. Ce phénomène, illustré dans la

figure 15, n'est pas spécifique à la sarcopénie mais témoigne d'une dénervation du muscle que l'on peut également retrouver au cours d'immobilisation ou de pathologies neurodégénératives comme la Sclérose Latérale Amyotrophique (SLA). Dans les muscles de d'individus jeunes, la mosaïque des différents types de fibres s'organise de façon homogène alors que chez les individus âgés on observe des regroupements ou agrégats de fibres d'un même type (**figure 15**).

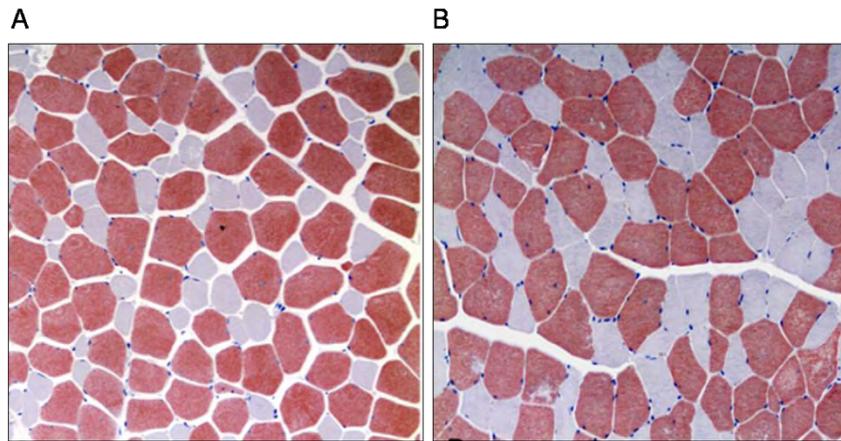


Figure 15 : Modification de la mosaïque de fibres dans le muscle de dauphin au cours du vieillissement.

Coupe transversale de muscle de dauphins tachetés d'atlantique, les fibres musculaires de type I sont marquées en bleu pâle et les fibres de types II en rouge chez des dauphins adultes (**A**) et âgés (**B**). La mosaïque des fibres musculaires tend vers une organisation en cluster de fibres II et de fibres de type I dont le nombre augmente avec l'âge.

Ces modifications s'expliquent par une dénervation des fibres de types II due à une altération de remodelage des unités motrices de ce type de fibre. En effet, au niveau des fibres de type II préférentiellement, la dénervation va entraîner une réinnervation à partir de la pousse d'un axone provenant d'une fibre de type I adjacente [128]. L'hypothèse la plus probable étant que les axones de unités motrices lentes innervant les fibres de type I soient capables de ramifier leur axone plus rapidement, la fibre de type II rapide, innervée par une unité motrice lente deviendrait alors une fibre avec des propriétés physiologique et biologique d'une fibre lente. Il existe également des fibres intermédiaires qui co-expriment des myosines lentes et rapides et qui apparaissent avec le vieillissement. Ces fibres pourraient résulter d'un changement de type de fibre précédant l'apparition d'agrégats.

B] Modification des facteurs circulants au cours du vieillissement

1/ Les facteurs de croissance et de différenciation

a. Insuline

L'insuline est une hormone hypoglycémisante sécrétée par les cellules β des îlots de Langerhans au niveau du pancréas. Elle intervient majoritairement dans la régulation du métabolisme des substrats énergétiques (glucose, acides gras et corps cétoniques). D'autre part, l'insuline stimule également la synthèse protéique dans le muscle *via* l'activation de la Phosphatidyl Inositol 3 Kinase (PI3K), qui convertit le phosphatidyl 4,5 phosphate (PIP2) en phosphatidyl 3,4,5 phosphate (PIP3). Il en résulte le recrutement de la PKD (*Phospho inositide Dependant Kinase*) qui phosphoryle Akt (aussi connue sous le nom de Protéine Kinase B : PKB), à l'origine d'une cascade de phosphorylations, conduisant notamment la phosphorylation inactivatrice du complexe hétérodimérique TSC1/2 (*Tuberous Sclerosis Complex*), permettant la levée d'inhibition du complexe sur mTORC1, et en particulier mTOR qui une fois activé, phosphoryle ses deux substrats : P70S6K et 4EBP 1.

Comme cité plus haut, le vieillissement s'accompagne de l'installation progressive d'une résistance à l'insuline dont les mécanismes associés à l'accumulation de lipides intra musculaires et les altérations mitochondriales ont été définis dans le chapitre précédant.

b. IGF1

IGF 1 (pour *Insulin Like Growth Factor 1*) est une hormone synthétisée par le foie sous l'influence de l'hormone de croissance (GH pour *Growth Hormone*). Elle est également sécrétée par les cellules musculaires et les cellules satellites du muscle squelettique. Les souris déficientes en IGF-1 présentent un retard de croissance, une faible masse musculaire et une létalité néonatale importante [129]. Au contraire, l'augmentation des taux circulants d'IGF-1 par manipulation génétique chez la souris jeune est associée à une hypertrophie musculaire [130]. Ce facteur de croissance est

notamment libéré localement en cas de lésion musculaire (suite à un exercice physique par exemple) et active les cellules satellites. De façon intéressante, la diminution de 80% de la production hépatique d'IGF-1, n'altère pas l'hypertrophie musculaire en réponse à un exercice physique, suggérant ainsi un effet paracrine de l'hormone dans le muscle et une induction locale indépendante de la GH [131].

IGF-1 agit sur le muscle *via* son récepteur IGF-1R, récepteur à tyrosine kinase, qui active directement la voie PI3K/Akt. Dans ce sens, ce facteur de croissance a un rôle anabolique, en stimulant la protéosynthèse par mTOR et en inhibant les voies de dégradation protéique par l'UPS et l'autophagie.

Au cours du vieillissement, les taux circulants d'IGF-1 ainsi que l'expression de son ARNm dans le muscle squelettique diminuent, respectivement de 33 et 45%, chez des individus de plus de 63 ans [132] [133].

c. Myostatine

La myostatine (ou GDF8 pour *Growth Different Factor 8*) est un régulateur négatif de la masse musculaire. En effet, comme le montre la **figure 16**, les animaux déficients pour cette protéine présentent un développement spectaculaire de leur masse musculaire [134].

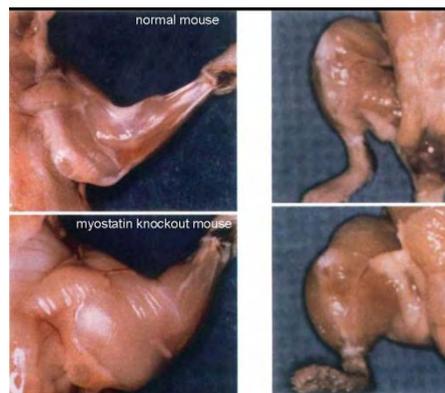


Figure 16 : Phénotype musculaire de souris myostatine *-/-*.

Au niveau des cellules musculaires adultes, la myostatine agit en se fixant sur le récepteur ActRIIB/A couplé à la protéine ALK4/5, phosphorylant smad 2 et 3. L'activation de smad 2 et 3, leur fixation à smad4 puis leur transfert nucléaire conduit à la régulation de gènes cibles. Smad 2 et 3 interagissent avec la voie PI3K/Akt, bien que les mécanismes sous-jacents soient encore mal connus. L'inhibition de cette voie entraîne une diminution de la synthèse protéique dépendante de mTOR [135]. La

myostatine joue également un rôle dans les cellules satellites puisqu'elle réprime la transcription de gènes impliqués dans la prolifération et la différenciation comme les MRFs comme MyoD et Pax7 [136].

L'évolution des taux de myostatine avec l'âge n'est pas clairement déterminée et la diversité des résultats obtenus dépend principalement de la méthodologie de dosage de ce facteur. Cependant, l'étude la plus récente à ce jour mettant en avant une nouvelle méthode de dosage par spectrométrie de masse, montre que les taux circulants de myostatine augmentent chez les femmes, alors qu'ils diminuent chez les hommes de plus de 60 ans [137].

2/ Les androgènes

a. La DHEA (De Hydro Epi Androsterone)

La DHEA est une hormone stéroïdienne, synthétisée à partir du cholestérol pratiquement exclusivement par le cortex des glandes surrénales. Il s'agit du stéroïde en plus grande quantité dans le corps. Lorsqu'elle circule dans le sang, la DHEA est couplée à l'albumine ou à la SHBG (*Sexe Hormones Binding Globulin*), distinguant ainsi leur forme libre (DHEA) de leur forme liée (DHEA-S).

Le rôle principal de la DHEA est d'être le précurseur des hormones sexuelles telles que la testostérone et les œstrogènes. Mais l'hormone a également des effets propres. De par sa petite taille et sa liposolubilité, la DHEA peut interagir avec des récepteurs membranaires ou pénétrer librement dans la cellule et se fixer à des récepteurs nucléaires. De façon surprenante, le ou les récepteurs impliqués dans les effets de la DHEA sont encore méconnus.

Comme montré dans la **figure 17**, les taux de DHEA circulants décroissent progressivement avec l'âge chez les hommes et les femmes. Les causes de cette diminution ne sont pas bien identifiées mais il pourrait s'agir d'une baisse de la production, d'une augmentation de sa dégradation ou bien des deux. Néanmoins, différentes études ont montré une corrélation positive entre les taux circulants de DHEA et la masse et la force musculaire au cours du vieillissement [139].

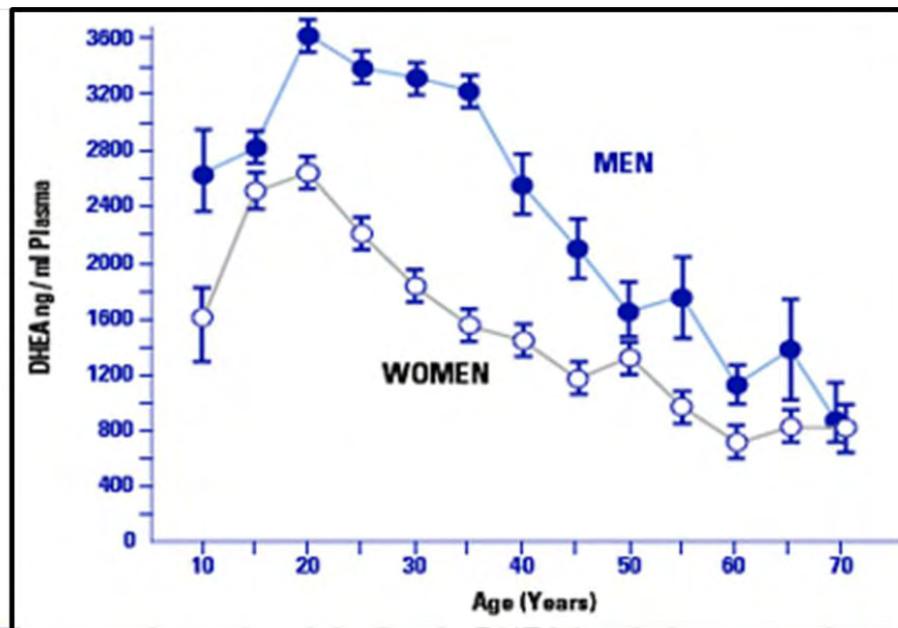


Figure 17 : Evolution des concentrations plasmatiques de DHEA chez les hommes et les femmes de 10 à 70 ans. [138]

b. Les hormones sexuelles

Les hormones sexuelles sont principalement représentées par la **testostérone** chez les hommes et les œstrogènes et progestérones chez les femmes. Les hormones féminines ne seront pas détaillées dans ce manuscrit, la progestérone étant principalement impliquée dans la fonction reproductive de la femme et les œstrogènes n'ayant pas encore été reliées au vieillissement musculaire.

Les hormones sexuelles (testostérone et œstrogènes) sont connues pour réguler la composition corporelle en augmentant la masse musculaire et en diminuant la masse grasse. Au cours de l'âge apparaît une altération de la fonction endocrine de l'organisme dont la plus décrite est la diminution progressive de sécrétion des hormones sexuelles, appelée andropause chez l'homme et ménopause chez la femme.

- **La testostérone**

Il s'agit d'une hormone stéroïdienne appartenant à la famille des androgènes. Elle est produite majoritairement par les gonades chez les hommes et les femmes, bien qu'en très faible quantité chez celles-ci. Dans une faible mesure, la testostérone est

synthétisée à partir de DHEA dans les glandes surrénales. C'est la principale hormone masculine et elle est impliquée notamment dans la régulation des caractères sexuels primaires et secondaires dont le développement de la masse musculaire par son effet bien connu d'anabolisant.

Au niveau du muscle squelettique on lui attribue différents rôles. Tout d'abord la testostérone est capable d'orienter la différenciation de cellules pluripotentes mésenchymateuses en culture dans les voies de la myogénèse [137]. Son injection *in vivo* à des souris entraîne une augmentation du nombre de cellules satellites et une hypertrophie musculaire [141]. De même, le traitement de cellules en cultures a démontré sa capacité à stimuler l'activation (*via* l'augmentation de Pax7) et la prolifération des cellules satellites [141]. De plus, d'autres expériences montrent que l'augmentation de la masse musculaire en réponse à une supplémentation est imputable à activation de la protéosynthèse *via* la stimulation de la voie Akt/mTOR et l'inhibition de la dégradation protéique *via* FOXO3a [141]. Enfin, la fixation de la testostérone au récepteur nucléaire des androgènes (RA) est accompagnée d'une augmentation des taux circulants de la GH et IGF-1 [141].

Chez les hommes, une diminution progressive des androgènes, appelée andropause est observée au cours de leur vie d'adulte. Ce phénomène se caractérise en particulier par une diminution progressive de la testostérone de 1 % par an à partir de 40 ans [142], coïncidant avec la perte de leur masse musculaire.

De nombreuses études se sont intéressées à la relation entre la modification des taux de testostérone circulants et la diminution de masse et de fonction musculaire au cours de la sarcopénie. Bien que la relation soit très modérée, elle ressort dans différentes études indépendamment des paramètres évalués et de la population cible [143], justifiant une supplémentation en testostérone (intervention décrite dans un chapitre suivant).

3/ Vitamine D

La vitamine D, ou 1,25 dihydroxyvitamine D, est une hormone liposoluble, retrouvée dans l'alimentation (harengs, saumon, anchois, sardine, margarine, œufs, champignons) et synthétisée par notre peau à partir d'un dérivé du cholestérol sous

l'effet des UV-B. Les apports journaliers recommandés sont de l'ordre de 5 µg par jour et sont retrouvés dans 100g de saumon, anchois, sardine, 800 grammes de margarine ou d'œufs ou 15 à 30 minutes d'exposition au soleil par jour. Les rôles physiologiques de la vitamine D transitent par la stimulation d'un récepteur nucléaire VDR (*Vitamin D Receptor*). Ceci permet la régulation de plus de 200 gènes (comme Bax, TGFβ, cycline D, IGF1, ...) associés à des effets concernant l'absorption intestinale et rénale de calcium et de phosphore et jouant un rôle sur l'ostéogénèse ainsi que sur différents tissus notamment le muscle strié squelettique [144].

Au niveau musculaire, des souris déficientes pour le récepteur VDR ou la vitamine D présentent une atrophie et une faiblesse musculaire [145]. Par ailleurs, l'expression du VDR est induite dans les cellules musculaires en différenciation contrairement aux cellules musculaires matures. Plus précisément, le traitement de lignée de cellules musculaires par du 1,25-(OH)₂D diminue l'expression des marqueurs de différenciation tels que Myf5, la myogénine et la chaîne lourde de myosine néonatale [146]. Cependant, le mode d'action moléculaire de ces effets n'est pas encore détaillé dans la littérature.

Au cours du vieillissement, on observe une diminution des taux plasmatiques de 1,25-(OH)₂ D associée à une diminution de la masse et de la fonction musculaire ainsi qu'à une prédisposition des personnes âgées à la chute, suggérant une supplémentation légitime pour compenser la détérioration musculaire liée à l'âge [147]. De façon intéressante, des taux élevés de vitamine D chez la femme sont corrélés à des télomères leucocytaires de plus grande taille, suggérant un rôle protecteur plus large que le seul niveau musculaire de cette hormone contre le vieillissement [148].

4/ Inflammation

L'inflammation est étroitement liée au vieillissement. En effet, l'installation progressive d'une inflammation pernicieuse représentée par une légère augmentation des taux de cytokines inflammatoires dans le sang est souvent retrouvée chez les personnes âgées. Ce phénomène est connu sous le nom d'« inflamaging » [149].

L'inflamaging se caractérise par une inflammation de bas bruit, asymptomatique, chronique et systémique [149]. On retrouve une augmentation de cytokines circulantes pro-inflammatoires comme l'IL6, l'IL1, le TNFα et la CRP (*C-reactive protein*), associée

à l'exacerbation de la morbidité et de la mortalité [150]. De plus, ces modifications entraînent une diminution des cytokines anti inflammatoires comme par exemple l'IL10 [150].

Pour comprendre le rôle de l'inflammation dans le muscle squelettique, il pourrait être utile de commencer par en décrire les principales étapes. Au cours d'une lésion ou d'un stress mécanique du tissu musculaire tel que l'on peut le retrouver suite à un exercice physique, les cellules lésées libèrent des interleukines et du TNF α . Ces cytokines inflammatoires induisent la production et la migration des macrophages sur le site de lésion qui vont à leur tour attirer des cellules inflammatoires : les neutrophiles. Les cellules ainsi recrutées (macrophages et neutrophiles) vont « nettoyer » le site de lésion en dégradant par phagocytose des débris cellulaires. Ce sont également des cellules sécrétrices qui libèrent notamment des facteurs de croissance permettant la reconstruction du tissu. En plus de leur forte capacité de phagocytose, les neutrophiles libèrent des radicaux libres qui participent à la destruction notamment d'agents infectieux. Le processus n'est pas spécifique des lésions et touche des cellules intactes avoisinantes, qui réagissent en libérant du NO (monoxyde d'azote) pour diminuer leur lyse et neutraliser d'ERO [151].

Au fur et à mesure du vieillissement, il apparaît une diminution des capacités anti-oxydantes du muscle squelettique et l'exposition des cellules musculaires aux substances toxiques (médicaments, polluants, ...) et radicaux libres qui en résultent, génèrent des stress intra cellulaires qui entretiennent la production de cytokines inflammatoires [151].

D'autres parts, les myocytes sont des cellules sécrétrices d'inflammation. Parmi les myokines, on retrouve l'IL6, qui est physiologiquement libérée en réponse à un stress comme l'exercice physique par les deux types de fibres I et II. Dans ce cas, l'IL6 est nécessaire à l'adaptation musculaire à l'exercice, puisqu'elle active des cellules satellites et stimule leur prolifération [152]. Il est à noter, que l'élévation d'IL6 n'est pas accompagnée d'autres cytokines pro-inflammatoires comme le TNF α . Au contraire, ce sont IL10, IL1 α (antagoniste d'IL1) qui prédominent, suggérant un rôle anti inflammatoire d'IL6 dans ce contexte [153]. Dans le cadre du vieillissement, les myocytes participent à l'inflaming et les taux élevés d'IL6 musculaires ont été associés à un fort facteur de risque au développement d'un déficit musculaire [154].

Les **cytokines inflammatoires retardent la régénération musculaire**. En effet la présence de TNF α induit la libération d'EROs qui vont altérer la fonction des cellules satellites et des cellules musculaires matures. *In vitro*, les myoblastes exposés au TNF α prolifèrent sans entrer dans les phases de différenciation [155]. De même, *in vivo*, les souris surexprimant le TNF α ou exposées à un traitement présentent un retard dans la régénération musculaire en partie expliqué par l'apoptose des cellules satellites dont la sensibilité augmente avec l'âge [156].

D'autre part, les cytokines **inflammatoires altèrent également les fibres musculaires** différenciées par leur action catabolisante. Ainsi, l'injection de TNF α à des rats induit la perte de leur masse musculaire. Cet effet est dépendant de deux phénomènes. D'une part de la dégradation protéique par l'activation du système UPS. D'autre part, par la fixation du TNF α sur ses récepteurs (TNFR 1 et 2), médiateurs de mort cellulaire, ce qui stimule l'apoptose. Ainsi le recrutement de DISC (*Death-Inducing Signaling Complex*), est capable d'activer la caspase 8, pilier dans la transduction du signal apoptotique [157]. De plus, des souris traitées au TNF α présentent des altérations de la contraction indépendamment de la perte de masse musculaire. Ces effets sont dépendants de la fixation du TNF α à ses récepteurs (TNFR 1 et 2) et à la libération d'ERO qui vont potentiellement gêner l'interaction actine-myosine [158] et altérer les capacités de contraction de la fibre musculaire.

Les mécanismes extrinsèques favorisant la sarcopénie se manifestent par une diminution de l'innervation, qui explique en partie l'altération de la fonction musculaire. De plus, la modification des facteurs circulants au cours du vieillissement vont dans le sens d'une diminution des facteurs anaboliques (Vitamine D et hormones sexuelles) associée à l'augmentation de facteurs catabolisant comme les cytokines inflammatoires.

III- LES MODELS EXPERIMENTAUX DE LA SARCOPENIE

A] Les souris

1/ Souris sauvages

Les souris et les rats ne sont pas épargnés par la perte de la masse et de la fonction musculaire au cours du temps. L'espérance de vie d'une souris, soumise à un stress modéré, est établie entre 2 ans et demi et 3 ans. Une étude publiée en juin 2015, montre le déclin de la puissance musculaire et de la contractilité au cours de toute la vie de souris C57Bl6. Les auteurs ont ainsi pu observer un déclin de la puissance, de la vitesse et de la force de contraction au sein de muscles glycolytiques comme l'*extensor digitorum lungus* (EDL) et oxydatifs comme le *soleus* chez la souris C57Bl6 âgée de 24 mois [159].

2/ Souris IL10^{-/-}

Les souris IL10^{tm/tm} sont génétiquement invalidées pour l'interleukine 10 (IL10) qui est une cytokine anti-inflammatoire. L'absence de cette cytokine génère une inflammation chronique de bas bruit récapitulant le phénotype inflammatoire observé au cours de l'âge (voir chapitre précédent). Le phénotypage de ces souris révèle qu'à l'instar de l'homme, ces souris présentent une augmentation des taux circulants d'IL6, une altération progressive de la force musculaire et de l'activité spontanée [160]. L'étude de l'expression génique à grande échelle (micro array) a révélé qu'une régulation différente de 125 gènes musculaires impliqués dans le fonctionnement mitochondrial et l'apoptose découlait de cette mutation. Ce modèle de souris, présentant une accélération du vieillissement à partir de 18 mois de vie, est indiqué pour étudier les mécanismes moléculaires du vieillissement et notamment la sarcopénie [160].

3/ Souris SAMP

Parmi les différents modèles de souris SAMP (pour *Senescent-Accelerated Mouse P*), SAMP8 apparaît être le plus sensible aux altérations musculaires [161]. Cette

souris présente une mutation du gène Ogg1 qui réduit l'activité de l'enzyme 8-hydroxy, 2'-deoxyguanosine (8 OHdG) qui excise les bases tronquées au cours des réparations de l'ADN. Ce défaut de réparation de l'ADN va générer des mutations « naturelles » conduisant à un phénotype de sénescence accélérée [161].

Récemment, une équipe a phénotypé plus précisément l'évolution du tissu musculaire au cours du temps chez ces animaux [161]. Les résultats montrent que ces souris présentent un pic de masse musculaire à 7 mois, puis un déclin de la masse et de la contraction musculaire associés à une augmentation des fibres de type IIa dans leurs muscles gastrocnémiens. Ces résultats ont conduit les auteurs à conclure que ces souris présentaient toutes les caractéristiques de la sarcopénie à 8 mois [161].

En plus de ces modèles très ciblés, il existe des modèles de syndromes progéroïdes qui correspondent à un ensemble de pathologies et qui se caractérisent par un vieillissement prématuré. Ils constituent un groupe d'altérations génétiques qui mime des événements cliniques précoces du vieillissement physiologique. Ainsi, les souris BUBR1 et Werner que nous allons détailler présentent des altérations dans la stabilité du génome et rentrent dans la catégorie des modèles de sénescence répllicative.

4/ Souris BUBR1

La ségrégation fidèle lors de la réplication des chromosomes au cours de la mitose est nécessaire au maintien de la stabilité du génome et il existe plusieurs « checkpoints » au cours de la mitose permettant de valider chaque étape. Parmi les protéines participant à ce contrôle, BUBR1 est localisée au niveau du kinétochore et s'assure de la bonne ségrégation au cours de l'anaphase en inhibant la formation du complexe APC (pour *Anaphase-Promoting Complex*, aussi appelé cyclosome). Des mutations de la protéine BubR1 sont associées à de nombreux cancers chez l'homme [162] et sa surexpression chez la souris provoque une augmentation de l'espérance de vie [163]. Cependant, les souris jeunes mutantes possédant de faibles niveaux de BubR1 présentent des syndromes progéroïdes et un phénotype de souris âgées marqué par le développement d'une cataracte, de la perte d'élasticité de la peau, d'une infertilité et d'une sarcopénie associée à une activation de p21 et p16Ink4 [118].

5/ Souris Werner

La protéine Werner est une RecQ-hélicase qui assure le déroulement et la séparation du double brin d'ADN nécessaire à la réplication de l'ADN en prévision de la division cellulaire. Cette protéine intervenant également dans la réparation de l'ADN où elle est nécessaire au maintien de la structure et de l'intégrité du génome. Un modèle de souris portant une mutation sur la protéine Werner a été générée par l'équipe de Michel Lebel (Université de Laval, Canada). A l'état homozygote, ces souris présentent une espérance de vie de 25 mois comparées au souris sauvages qui atteignent 36 mois et présentent l'apparition de symptômes de maladies liées au vieillissement de façon prématurée telles que la diminution de la densité osseuse, érosion télomérique, cancers, diabète, etc... [164]. Ce modèle murin présente une sénescence réplivative, retrouvée chez les humains sous le terme de syndrome de Werner qui appartient à la famille des maladies progéroides au cours desquelles les sujets présentent des signes de vieillissement dès les 10 premières années de vie [164].

B] Les rats

1/ Les rats Sauvages

Chez le rat, c'est la souche « Winstar » qui est principalement utilisée pour étudier le vieillissement. Une étude réalisée sur 528 animaux a montré que la masse musculaire est fortement corrélée à la masse corporelle (**figure 18**).

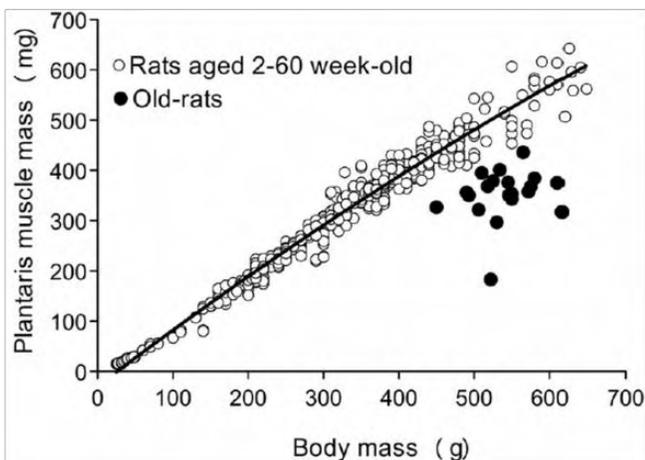


Figure 18 : corrélation entre les masses musculaire et corporelle au cours de l'âge.[165]

Chez plus de 500 rats, l'augmentation de la masse du muscle plantaris est corrélée à la prise de poids au cours de l'âge ($R^2=0,9735$). Cependant avec le vieillissement, il y a une rupture de cette corrélation qui correspond à l'état sarcopénique.

Cependant, chez les rats très âgés (30 mois), cette corrélation est perdue. Ceci signifie qu'un arrêt de la croissance musculaire s'est produit alors que la masse corporelle continue d'augmenter ce qui indique un état sarcopénique [165].

2/ Souche de Rats OXYS

Les rats OXYS, modèle de sénescence accélérée, ont été largement étudiés dans des contextes de cataracte et de rétinopathies. L'équipe de Vladimir Skulachev a été la première, en 2014, à étudier leur phénotype musculaire [166]. Les auteurs ont mis en évidence un nombre important d'altérations de la structure et du fonctionnement mitochondrial dès l'âge de 3 mois. Ces mécanismes étaient associés à une hypoplasie (diminution du nombre de fibres musculaires) ainsi qu'à une atrophie musculaire comparable à des rats âgés [166].

En plus des modèles murins, les modèles non rongeurs sont de plus en plus étudiés pour plusieurs raisons comme leur coût relativement faible, leur fort rendement de reproduction ou leur petite taille. Leur principal avantage restant leur durée de vie limitée comparée au murins : 2 à 3 mois pour les drosophiles ou 3 semaines pour *C.elegans*.

C] Les modèles non rongeurs

1/ La Drosophile

Drosophila melanogaster, appelée plus communément drosophile, est un modèle intéressant pour l'étude du vieillissement et plus particulièrement de la sarcopénie. Au niveau musculaire, les drosophiles se rapprochent fortement des mammifères. Elles possèdent plus de 78 muscles au niveau du thorax et la structure, l'organisation de ces muscles et les phénomènes d'atrophie et d'hypertrophie sont comparables à ceux des mammifères (**figure 19**). Cependant, quelques différences sont à noter et montrent les limites de ce modèle. En effet, la mouche ne possède pas d'équivalent aux cellules satellites, cellules souches résidentes ce qui ne permet pas d'étudier les mécanismes de régénération. De la même façon, ce n'est pas un modèle pour étudier l'innervation musculaire [167].

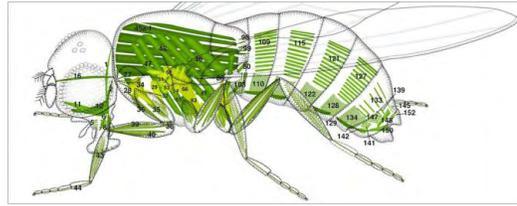


Figure 19 : Schéma de l'organisation des muscles squelettiques chez la drosophile

(D'après l'*Atlas of Drosophila Development* de Volker Hartenstein).
Les muscles de la drosophile sont schématisés en vert.

2/ Caenorhabditis elegans

Ce nématode est un petit ver transparent d'environ 1 mm de longueur, capable de se reproduire tous les 3 jours et jouissant d'une durée de vie de 3 semaines en moyenne. Ce modèle est très utilisé en laboratoire pour l'étude de l'apoptose, du développement embryonnaire et du vieillissement cellulaire [168]. Il s'agit du modèle de base pour étudier les mécanismes génétiques du vieillissement et jusqu'à présent 50 mutations allongeant la durée de vie ont été découvertes grâce à ce modèle [169]. Cependant, peu de choses sont connues sur les physiopathologies du vieillissement chez cette espèce. Le système nerveux est remarquablement conservé même chez les vers « âgés », ce qui n'est pas le cas du muscle, qui se détériore progressivement, de façon comparable à la sarcopénie chez l'homme [170].

3/ Le poisson Africain killifish

Jusqu'à récemment, l'inconvénient de l'étude du vieillissement sur des modèles vertébrés était leur longue durée de vie (Zebrafish, 3 à 5 ans ou souris/rat 3 ans). En février 2015, l'équipe d'Anne Brunet de l'université de Stanford a publié un article présentant un modèle vertébré dont le génome avait été séquencé et possédant une durée de vie de 6 mois : le Killifish turquoise d'Afrique. Cette étude démontre que ce modèle animal, à la longévité assez courte, implique des mécanismes connus liés au vieillissement tels que le raccourcissement des télomères. Ainsi, ce poisson pourrait être un bon support pour des modèles génétiques qui permettraient l'étude des pathologies associées au vieillissement [171].

PARTIE III

Quels sont les traitements d'aujourd'hui et de demain contre la sarcopénie ?

A] Interventions comportementales

1/ Exercice physique

L'exercice physique comme thérapie est utilisé pour améliorer le confort des patients atteints de certaines pathologies comme les cancers, les dépressions ou encore les cirrhoses. Au niveau de la perte musculaire liée à l'âge, les effets d'une pratique d'activité physique ont été largement étudiés et se sont révélés efficaces pour limiter ou prévenir la perte de la masse liée à l'âge. Cependant, nous allons voir dans les prochains chapitres que les effets obtenus sont très dépendants du type d'exercice, de l'intensité et de la fréquence de sa réalisation.

a. Les différents types de contraction et d'exercices

Pour comprendre les mécanismes de contraction musculaire et leurs conséquences, il est nécessaire de faire quelques rappels des lois physiques de Newton auxquelles le muscle n'échappe pas. La force d'un muscle se définit par la tension qu'il développe pour mobiliser un groupe musculaire. La vitesse du mouvement ainsi générée dépend de la force initiale ainsi que des forces extérieures. Si celles-ci sont supérieures à la force développée par le muscle (force initiale), la vitesse sera nulle (par exemple au tir à la corde). Classiquement, la puissance d'un muscle est le produit de la force par la vitesse et est étroitement liée à l'énergie dépensée par le muscle pour se contracter. Selon le type d'exercice et de contraction, ce sont la force, la puissance ou les deux que l'on sollicite.

- **Les contractions isométriques**

Le muscle se contracte sans modification de sa taille. Il n'y a pas de déplacement d'un segment corporel sur un autre. Les ponts acto-myosines sont présents et génèrent une force inférieure à celle des résistances extérieures (**figure 20A**).

Au cours du vieillissement, la force isométrique diminue progressivement chez les hommes et les femmes, de 30 à 47 %. Cette perte fonctionnelle est observable vers 45 ans chez les hommes et un peu plus tôt chez les femmes, bien que la perte soit plus lente et au final moins importante que celle des hommes [172].

- **Les contractions isotoniques**

C'est un mouvement dynamique. On peut distinguer deux types de contractions isotoniques : concentrique et excentrique. Au cours de la première, les ponts acto-myosines se font et se défont pour faire glisser les filaments épais sur les filaments fins entraînant le raccourcissement du muscle et le déplacement d'un groupe musculaire autour d'une articulation. Elle permet le déplacement du corps lors d'activité physique comme la course à pied ou le déplacement d'objet (**figure 20B**). Au cours de la deuxième, l'allongement du muscle se produit parce que les résistances extérieures agissent en opposition lors de rétro-pédalage par exemple (**figure 20C**). Ce type d'exercice a été associé à des blessures musculaires et son utilisation est en générale liée à la rééducation en cas de lésions tendineuses [173].

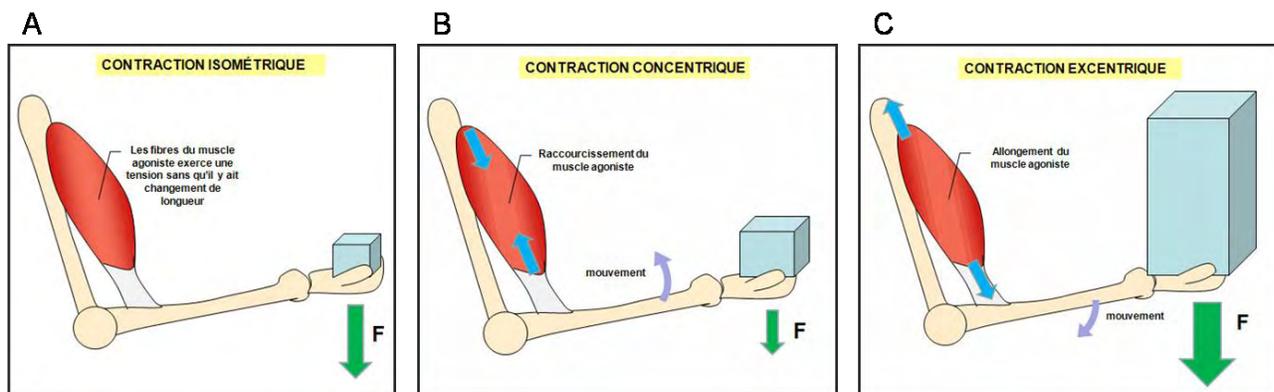


Figure 20: Caractéristiques des différentes contractions musculaires

A: Le muscle biceps représenté ici exerce une force égale à la force extérieure notée « F », ainsi il n'y a pas de mouvement de l'articulation. La longueur des fibres n'est pas modifiée définissant une contraction isométrique. **B:** Si la force extérieure est inférieure à la force exercée par le muscle, l'avant bras se rapproche de l'articulation par raccourcissement des fibres musculaires du biceps, selon une contraction concentrique **C:** Si la force est supérieure à la force de contraction au contraire, l'avant-bras s'éloigne de l'articulation et les fibres s'allongent décrivant une contraction excentrique.

Au cours du vieillissement, on observe une perte progressive des forces isotoniques concentriques et excentriques. Chez une population de sujets âgés (62 à 89 ans) comparée à des individus jeunes (de 20 à 29 ans), la force excentrique est plus résistante au temps que la force concentrique. En effet, les personnes âgées de cette étude voient leur force concentrique diminuée de 41,7 et 53,4% respectivement pour les hommes et les femmes. La force excentrique ne diminue elle que 24,9 et 38,3% [174].

b. Les différents types d'exercices

On peut classer les exercices physiques en deux catégories: l'endurance et la résistance.

- **Endurance**

Par définition, les exercices d'endurance se pratiquent pendant une durée longue et à une intensité moyenne comprise entre 50 et 80 % de la fréquence cardiaque maximale. Les effets bénéfiques de ces exercices sur la santé sont nombreux et à tous les âges. De l'amélioration du système immunitaire, à la perte de poids, en passant par la stimulation de l'angiogénèse au niveau du muscle squelettique et des renforcements cardiaques, ces exercices potentialisent de nombreuses fonctions [175]. Les exercices d'endurance dépendent du métabolisme aérobie qui sollicite une adaptation périphérique et centrale de la consommation d'oxygène par les tissus et la capacité du muscle squelettique à générer de l'énergie par le métabolisme énergétique. Ces adaptations comprennent la stimulation de la biogénèse mitochondriale, médiée par l'activation de PGC1 α , la quantité de myoglobine, la densité capillaire, le stockage des substrats et l'activité des enzymes oxydatives [176]. Par ailleurs, ces modifications sont accompagnées d'une légère amélioration de la force musculaire, plus particulièrement suite à la pratique de vélo ergométrique.

Pour preuve de cette potentialisation, plusieurs études [177] [178] ont montré une augmentation du pic de VO₂max au cours d'un exercice d'endurance sur vélo ergométrique chez des sujets âgés. C'est ainsi que l'équipe canadienne de Russel Hepple décrit que la pratique de vélo 3 fois par semaine pendant 30 minutes par des personnes âgées (65-74 ans) permet d'augmenter de 16% le pic de consommation d'O₂ ainsi que la charge de travail (+11%) au bout de 9 semaines. Après 18 semaines

d'entraînement, le pic de VO₂max est augmenté de 6% et est associé à l'accroissement de 35% de la densité capillaire entre les fibres musculaires [179]. D'autres études ont également révélé une augmentation du pic de VO₂max allant de 8 à 20% après un entraînement de 12 à 24 semaines, à raison de 3 à 5 fois par semaines pendant 30 à 60 minutes et à une intensité de 50 à 85 % des capacités cardiaques maximales.

- **Résistance**

Au contraire de l'endurance, l'exercice en résistance se pratique pendant une courte durée à une forte intensité. Il permet de moduler la force et la puissance musculaire, en induisant majoritairement un remodelage au niveau neuromusculaire. Ce type d'exercice permet d'améliorer le statut physique des individus ainsi que de prévenir l'incapacité motrice. Ainsi, chez des personnes âgées, un entraînement physique de forte intensité durant 16 semaines à raison de 3 sessions par semaines améliore la puissance des membres inférieurs sans modifier la force musculaire [180]. L'équipe de Fielding a évalué deux types d'exercice de résistance sur 30 patients de plus de 70 ans, qui s'étaient eux-mêmes identifiés comme ayant des difficultés à se mouvoir.

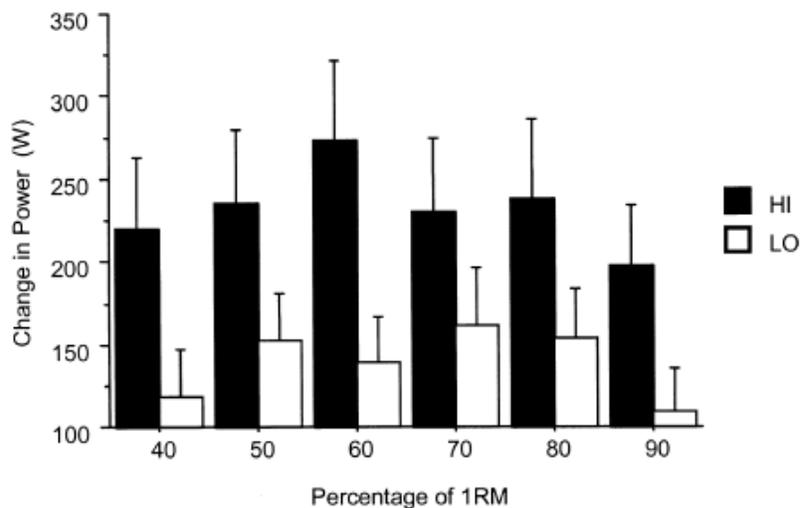


Figure 21 : Amélioration de la puissance musculaire suite à un programme d'entraînement en résistance à vitesse élevée ou faible. [180]

Le graphique représente l'augmentation de puissance musculaire des membres inférieurs de sujets âgés ayant pratiqué un entraînement physique en résistance à faible vitesse (colonnes blanches-LO) ou élevée (colonnes noires-HI). Les mesures ont été réalisées à différentes intensités : pourcentages de la force maximale développée par le sujet (1RM= one repetition maximum).

Durant 16 semaines, 15 patients ont été randomisés pour un programme d'entraînement en résistance à vitesse « élevée » alors que le reste de l'étude pratiquait un exercice

traditionnel à vitesse « réduite ». Comme le montre la **figure 21**, la force musculaire apparaît augmentée dans les deux groupes mais la puissance musculaire est potentialisée uniquement dans le groupe ayant pratiqué un exercice à vitesse élevée [180].

La même année, Campbell et ses collaborateurs ont examiné pendant 14 semaines 29 patients sédentaires âgés de 54 à 78 ans et répartis en trois groupes : contrôle sédentaire, entraînement en résistance des membres inférieurs et entraînement en résistance du corps entier [181]. L'exercice en résistance a augmenté la force musculaire dans les deux groupes entraînés sans distinction de l'entraînement des membres inférieurs ou du corps entier. Le nombre de muscles sollicités n'influence donc pas l'hypertrophie induite par l'exercice.

Par la suite, une étude menée par Goodpaster a comparé un groupe de sujets subissant la combinaison de différents exercices de résistance à un groupe de sujets inclus dans un programme de santé éducateur. Après 1 an, les patients du programme présentaient une diminution significative de la masse musculaire ainsi qu'une infiltration de dépôts adipeux, complètement prévenus dans le groupe d'intervention physique [182]. Enfin Farinatti et d'autres ont montré qu'un entraînement fréquent de 2 à 3 répétitions par semaine conduisait à un gain de force supérieure à une fréquence de un entraînement par semaine [183]. Plus surprenant, un exercice de faible intensité (40-50%) permettrait un développement plus important de la puissance musculaire par rapport à une intensité élevée (70-80%) [184].

Finalement, il semble que des exercices d'intensités modérées à fortes (65-80%) améliorent la force musculaire, alors que des intensités plus faibles favorisent la puissance chez une population âgée. Par ailleurs, au cours de la première semaine d'entraînement, une pratique par semaine augmente la force de la même façon qu'une pratique 3 fois par semaine alors que dans des périodes plus longues d'entraînement, une fréquence élevée potentialise le gain de force musculaire.

En conclusion, les différentes études concernant le type d'exercice chez la personne âgée suggèrent que l'entraînement en résistance est adapté pour augmenter la force et la masse musculaire alors que l'endurance permet de maintenir voire d'améliorer les capacités aérobies. Ainsi, les recommandations pour les personnes âgées à risques de développer une sarcopénie doivent inclure un équilibre entre les deux types d'exercices pratiqués de façon régulière au moins 3 fois par semaine. Cependant, les populations de personnes âgées présentent des difficultés physiques et de volontarisme à la pratique d'activité physique à une fréquence aussi importante. C'est pourquoi, d'autres approches interventionnelles ou pharmacologiques décrites dans les prochains chapitres visent à alléger les contraintes imposées par l'activité physique.

2/ Nutrition

a. Apport protéique

- **Recommandations pour les personnes âgées**

Une des conséquences de la résistance anabolique qui s'installe avec l'âge est que les personnes âgées doivent consommer plus de protéines que les sujets jeunes pour atteindre leur seuil anabolique et déclencher les mécanismes de synthèse protéiques. Les recommandations d'apport protéique pour les personnes âgées doivent être supérieures à 20 g par repas dont 2.5 à 2.8 g de leucine [185]. La leucine est particulièrement étudiée le contexte de la sensibilité du muscle aux substrats car, parmi les acides aminés, elle semble être l'activateur le plus puissant de la voie de la synthèse protéique médiée par mTOR [186]. Des évidences émergentes suggèrent que les sujets âgés consommant moins de 1 à 1.5g/kg/jour (soit environ 90g de protéines par jour pour un individu de 70kg) de protéines sont des candidats potentiels pour une intervention de supplémentation protéique afin de prévenir et/ou atténuer la sarcopénie [187].

Cependant, la capacité de l'apport protéique à atteindre le seuil anabolique dépend de la quantité mais également de la qualité des protéines et notamment des acides aminés qui les composent. En effet, la vitesse d'absorption et les effets métaboliques des acides aminés ne sont pas les mêmes selon le type de protéines ingérées et dépendent des caractéristiques moléculaires de celles-ci. Par exemple, par rapport à la consommation de lait entier (contenant majoritairement de la caséine), celle de lactosérum est associée à une digestion et une absorption plus rapide provoquant une augmentation des acides aminés biodisponibles. Ceci favorisant la synthèse protéique du muscle squelettique en période post prandiale. Ces différences ont été imputées à la forte concentration de leucine composant les protéines présentes dans le lactosérum par rapport à la caséine [188].

- **Leucine et acides aminés ramifiés**

La leucine est un acide aminé essentiel présent dans le blé, le thon, les arachides, le saumon, le bœuf ou encore les poids chiches. La leucine appartient, comme la valine et l'isoleucine, à la famille des acides aminés ramifiés qui, contrairement aux autres acides aminés, sont exclusivement métabolisés par le muscle squelettique (**figure 22**). En 2005, l'équipe de Didier Attaix a montré que la supplémentation en leucine chez des rats âgés de 22 mois restaurait les capacités d'inhibition de la protéolyse dépendante du protéasome en réponse à l'alimentation [63]. Par ailleurs, chez l'homme, l'apport alimentaire de leucine augmente la phosphorylation de P70S6K et 4E-BP1 musculaires qui sont capables d'augmenter la transcription de gènes impliqués dans la synthèse protéique [189]. En plus de la régulation positive de la balance protéique basale, une stratégie de supplémentation en acides aminés ramifiés combinée à un entraînement de résistance favorise l'anabolisme musculaire par la modulation des taux sériques de testostérone et cortisol [190].



Figure 22 : Structure chimique les acides aminés ramifiés.

- **La Créatine**

La créatine, un tripeptide composé de trois acides aminés (glycine, arginine et méthionine) est présente dans la viande et le poisson. Elle est stockée chez l'homme à 95% dans le muscle squelettique sous forme de phosphocréatine, principalement dans les fibres musculaires de types II. Les quantités de phosphocréatine totale du corps semblent diminuer avec l'âge bien que toutes les études ne fassent pas consensus [191] [192]. Cependant, il semble qu'un apport exogène par voie orale ait la capacité de faire augmenter les taux de créatine musculaire. De plus, cette supplémentation combinée à un entraînement physique en résistance est associée à une augmentation de la masse maigre résultant en une potentialisation dans la réalisation d'activités de la vie quotidienne [193]. Enfin, une étude menée en 2008 montre que la chronologie d'apport en créatine (avant et après l'activité physique) apparaît plus pertinente que la dose ingérée (0.03 à 0.5 g /kg) [194].

b. Restriction calorique (RC)

La restriction calorique (RC), comme son nom l'indique est un régime alimentaire pauvre en calories ingérées pouvant aller d'une réduction de 30 à 50%. Bien qu'un allongement de la durée de vie sur les différents modèles expérimentaux testés (rongeurs, bactéries, vers, singe) (**figure 23**).

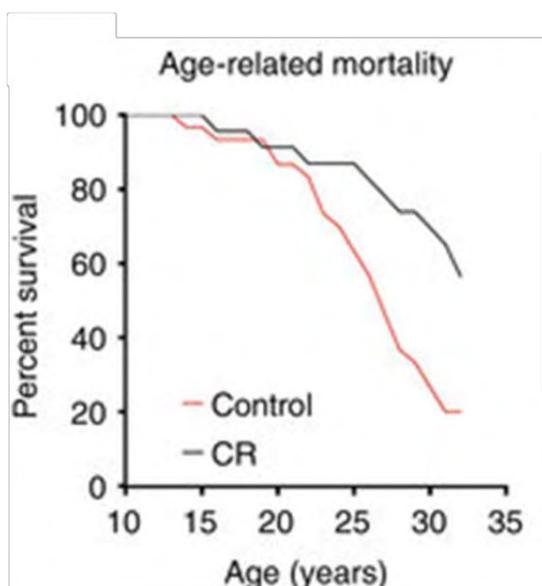


Figure 23 : Effet d'une restriction calorique sur la durée de vie de singes macaques Rhesus.

Les singes âgés entre 7 à 14 ans sont soumis à une restriction calorique de 30% *ad mortem*. Le régime allonge significativement la durée de vie des animaux par rapport aux sujets contrôles ($P=0.007$).

Les mécanismes par lesquels ce type d'intervention retarde le processus de vieillissement sont en cours d'approfondissement. Cependant, la RC semble impliquer des mécanismes de régulation du statut d'oxydoréduction cellulaire au niveau musculaire. En effet, les expériences de restriction calorique sont associées à une modulation de gènes liés au renouvellement des cellules elles-mêmes ou de leurs organites ainsi qu'au métabolisme énergétique et processus de mort et de survie cellulaire [195]. Chez le rongeur et le singe rhesus âgés, une restriction calorique de 20 à 40% à court ou long terme montre de nombreuses améliorations musculaires. Premièrement, la RC augmente la masse musculaire *via* l'hypertrophie des fibres de type I et II (soleus, gastrocnémien) et prévient la perte des fibres de type II [196], ainsi qu'une diminution de l'apoptose médiée par l'EndoG et d'AIF [195] classiquement associés au vieillissement. Ensuite, la RC joue sur la mitochondrie en augmentant son activité (mesurée par la citrate synthase) et présente un effet anti-oxydant en diminuant la production d'ERO et en augmentant l'expression de SOD (Super Oxyde Dismutase) et la sirtuine 3 musculaires, protéines mitochondriales antioxydantes [197]. Plusieurs évidences suggèrent également que la RC pourrait atténuer l'atrophie musculaire en diminuant la perte du nombre de fibres musculaires. Des rats âgés de 26 mois suivant une restriction calorique pendant plus de 20 mois présentent un nombre de fibres musculaires, des taux musculaires et plasmatique de TNF α , une apoptose caspase dépendante ainsi qu'une fragmentation de l'ADN, comparables à des rats de 6 mois ayant eu une alimentation *ad libitum*. Les effets bénéfiques ainsi observés sont indistincts pour des muscles oxydatifs ou glycolytiques [198]. D'autres études ont mis en évidence la capacité de la RC à réduire l'incidence des mitochondries aberrantes, et à augmenter l'expression de gènes impliqués dans le stress oxydant [199]. Enfin, en 2015, une étude portant sur 238 individus sains âgés de 20 à 50 ans et soumis à une restriction calorique pendant 2 ans est envisagée afin de déterminer l'impact de ce type d'intervention sur la longévité. L'étude apporte les premiers éléments issus d'un essai clinique contrôlé et randomisé. Les auteurs concluent que la restriction calorique chez les sujets âgés est faisable en raison de l'absence d'impact sur leur qualité de vie et apparaît suffisant pour améliorer des paramètres impliqués dans les phénomènes de longévité tels que la dépenses énergétiques, le cholestérol et triglycérides circulants, l'HOMA-IR déjà mis en évidence chez le rongeur [200].

c. La Vitamine D

Comme nous l'avons déjà évoqué dans le premier chapitre de ce manuscrit, différentes études ont pu mettre en évidence un lien entre la diminution des concentrations plasmatiques de Vitamine D et la perte progressive de masse musculaire. A partir de ce constat, plusieurs travaux rapportent des effets bénéfiques d'une supplémentation en vitamine D sur la force musculaire. En effet, l'équipe de Sato a montré que chez une population de personnes âgées déficientes en 25-hydroxyvitamine D (>25 nmol/ ou 10ng/ml), un traitement quotidien de 1000UI d'ergocalciferol pendant 2 ans, permettant d'augmenter les taux circulants de 25-hydroxyvitamin D et de la 1,25-dihydroxyvitamin D, s'accompagnait d'une diminution de 59% du risque de chutes [201]. Les auteurs montrent que ces effets s'expliquent en partie par une augmentation de la force musculaire ainsi que du nombre et de la taille des fibres musculaires de type II [201]. De manière similaire, une méta analyse récente de 8 études cliniques souligne qu'une supplémentation en vitamine D de 700 à 1000 IU par jour diminue le risque de chute de 19% [202]. Cependant des concentrations plasmatiques en vitamine D inférieures à 700 IU et en 25-Hydroxy Vitamine D inférieure à 60nmol/l ne permettent pas de modifier le risque de chute [202]. De plus, des éléments convergent également vers un effet neurotrophique de la vitamine D, puisque en plus de l'effet direct de la supplémentation sur la fonction musculaire, elle affecte également le contrôle neuromusculaire ainsi que la coordination [203].

d. Les anti-oxydants

Nous avons vu dans le premier chapitre de ce manuscrit que le stress oxydant était dû à une augmentation de la production des espèces réactives de l'oxygène (ERO) et à une diminution des défenses anti-oxydantes de l'organisme au cours du vieillissement musculaire. Ainsi, des stratégies nutritionnelles permettant de réduire les ERO ont été envisagées chez la personne âgée afin de mieux maîtriser les effets du stress oxydant.

- **Caroténoïdes et Vitamine E**

Les différents travaux entrepris dans ce domaine montrent que les antioxydants privilégiés dans la lutte contre le vieillissement musculaire sont les caroténoïdes et les vitamines E et C retrouvés dans les haricots, les pommes de terres, les noix de pecan, les pommes, prunes et fruits rouges [204]. Il a pu être démontré que la supplémentation en caroténoïdes ou en vitamine E inactivait les radicaux libres et régulaient négativement la transcription de gènes tels que NF-kB, IL6 et d'autres facteurs pro inflammatoires [205]. Ces observations sont dans la lignée de plusieurs études montrant qu'un régime alimentaire riche en fruits et légumes est associé à une diminution du risque d'inflammation (IL6), d'hypertension, de diabète, de sarcopénie et de mortalité [206]. De plus, plusieurs études suggèrent qu'une supplémentation quotidienne en vitamine E de 800 à 1000 IU (pendant 1 à 3 mois), diminuerait les marqueurs de stress oxydants après un exercice physique chez des sujets jeunes et âgés [207] [208]. Ces observations semblent donc montrer que l'apport de vitamine E améliore l'adaptation de l'organisme à l'exercice physique et limite les altérations musculaires qui en résultent [208].

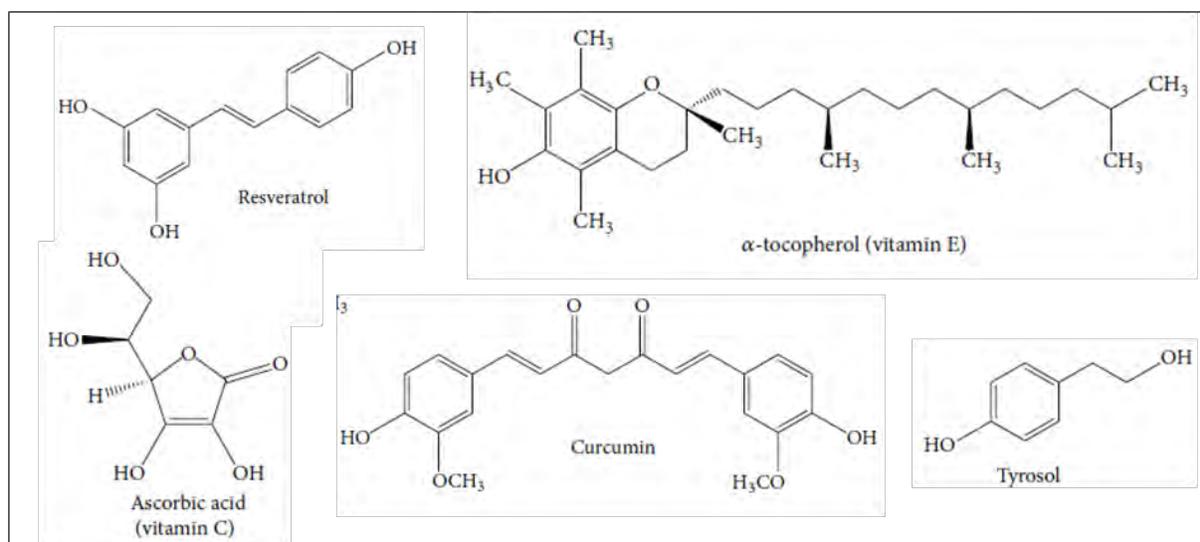


Figure 24: Formule chimique de certains antioxydants.

- **Polyphénols**

Parmi les molécules naturelles issues du métabolisme des plantes on distingue également les polyphénols, molécules organiques riches en groupements hydroxyles leurs conférant un puissant effet antioxydant (**figure 24**). Leur propriété suscite de plus

en plus d'intérêt pour la prévention et le traitement du cancer, des maladies inflammatoires, cardiovasculaires et neurodégénératives. Récemment, l'effet anti-âge du resveratrol a été mis en avant [209]. Il s'agit d'un composé phénolique synthétisé par les plantes, les protégeant contre les infections fongiques et les irradiations des ultra-violet. Bien que des effets bénéfiques sur le muscle de rats âgés *via* l'activation de la sirtuine 1, PGC-1 α et l'AMPK, aient été mis en avant au cours de l'immobilisation les résultats sur des animaux âgés restent peu convaincants. En effet, la supplémentation pendant 10 mois en resveratrol chez des rats âgés n'a pas d'effet sur la masse et fonction musculaire malgré une augmentation de l'activité de la MnSOD [210]. Par ailleurs, une étude plus récente montre qu'un entraînement physique en résistance entraînant une hypertrophie modérée du muscle plantaris de souris de 24 mois n'est pas potentialisée par une supplémentation en resveratrol [211]. De façon encore plus surprenante, la supplémentation en resveratrol chez des rongeurs âgés montre une diminution de la masse des muscles ainsi qu'une force isométrique atténuée [211].

Parmi d'autres antioxydants naturels on retrouve le curcumin, principal composant de la poudre jaune extraite du curcuma ou le tyrosol, majoritairement présent dans l'huile d'olive. En juillet 2015, une équipe a montré que la supplémentation en curcumin potentialisait l'effet de l'exercice physique sur la biogénèse mitochondriale cependant aucune étude à ce jour ne traite de ses effets du vieillissement musculaire [212].

e. Acides gras $\Omega 3$ à longues chaînes

Les acides gras poly insaturés à longue chaîne appelés oméga-3 ($\omega 3$, définissant l'organisation de leurs doubles liaisons) comme l'EPA (eicosapentaénoïque) et la DHA (acide docosahexaénoïque) sont principalement retrouvés dans les poissons gras (comme le saumon), le colza, le lin, les noix et le soja (liste non exhaustive).

Sous l'action de la cyclo-oxygénase et de la lipoxygénase, les $\omega 3$ sont transformés en tromboxanes, prostaglandines ou leucotriènes, ayant une action pro-agrégante et vasoconstrictrice. Par une autre voie métabolique moins décrite, les $\omega 3$ conduisent à la production de médiateurs locaux générés au cours d'une phase de résolution de l'inflammation appelés "*resolution-phase interaction products*" ou résolvines [213]. Au niveau du muscle strié squelettique, les $\omega 3$ ont démontré leurs actions anti-

inflammatoires et anaboliques. En effet, des études montrent que l'apport quotidien de 1 à 4 g d'oméga-3 pendant 2 à 3 mois chez des hommes et des femmes âgés de plus de 60 ans entraîne une augmentation de la synthèse protéique *via* la phosphorylation de mTOR^{Ser2448} et P70S6K^{Thr389} et potentialise les effets bénéfiques d'un entrainant physique de résistance [214] [215].

B] Interventions médicales

1) Thérapie cellulaire

Des études de greffes tissulaires et de parabioses hétérochroniques révèlent que des facteurs dérivant du microenvironnement tissulaire et systémique, modifiés avec l'âge, affectent la fonction des cellules satellites. Ces facteurs myogéniques et circulants issus d'animaux jeunes sont capables de « rajeunir » les capacités de régénération d'animaux âgés en agissant sur leurs cellules satellites. A l'inverse, la fonction des cellules satellites des animaux jeunes est altérée lors de ce type de parabiose. De façon très intéressante, ceci suggère que des facteurs circulants provenant des animaux âgés sont capables d'agir de manière délétère sur les cellules satellites [216] [217]. Dans ce contexte, différents facteurs circulants augmentant avec l'âge ont été identifiés comme régulateurs de la fonction des cellules satellites tels que Fgf-2 et le TGFβ, facteurs dérivés de la niche cellulaire, induisant l'expression de p16, p15, p21 et p27 inhibiteurs de la prolifération des cellules souches [218]. D'autres facteurs circulants se sont également rajoutés à la liste comme le GDF11 [126] et l'ocytocine [219]. Au niveau intracellulaire, des travaux ont pu montrer que malgré la bonne résistance des cellules satellites aux lésions de l'ADN, une diminution des défenses anti-oxydantes avec l'âge mêlée à une exposition à des stress génotoxiques était néfaste pour l'ADN de ces cellules [220]. Ces dommages n'expliquent pas à eux seuls toutes les altérations des cellules satellites et d'autres travaux sont en cours afin d'identifier de nouvelles cibles intracellulaires intervenant potentiellement dans la perte de fonction de ces cellules.

Récemment, une série d'articles publiés dans la revue *Nature Medicine*, a montré que les voies p38 MAPK et JAK/STAT3 (*Janus kinase-Signal transducer and activator of transcription 3*) contribuaient à la perte de la population des cellules satellites après une

agression tissulaire en ciblant leur capacité de prolifération et d'auto renouvellement [221], [123], [122], [222].

Compte tenu des résultats controversés sur les modifications intrinsèques des cellules satellites au cours du vieillissement, la thérapie cellulaire pour traiter la sarcopénie avec des cellules souches myogéniques n'est pas encore d'actualité. D'un point de vue fondamental, le manque d'évidences justifiant que les cellules satellites et la régénération sont nécessaires à l'homéostasie musculaire au cours du vieillissement, affaiblissent la notion de "régénération musculaire altérée", décrite comme étant une cause importante de la sarcopénie. La découverte de nouveaux agents et les études sur les approches pharmacologiques sont donc majoritaires dans la littérature à l'heure actuelle.

2) Les approches pharmacologiques pour lutter contre la sarcopénie

a. Hormonothérapie : androgène et modulateurs sélectifs des récepteurs aux androgènes.

- **DHEA**

La DHEA et son ester de sulfate (DHEAS), précurseurs de nombreuses hormones sexuelles (**figure 17** facteurs extrinsèques de la sarcopénie) diminuent progressivement chez les hommes et les femmes avec l'âge (de 18 à 40 ans taux circulants compris entre 1,33 et 7,78 ng/ml, à partir de 40 ans, entre 0,63 et 4,7 ng/ml) [223]. Ces observations ont motivé des recherches visant à restaurer les concentrations circulantes dans le but de reverser les changements physiopathologiques dus au vieillissement. L'hypothèse étant que l'augmentation des taux de DHEA permettrait l'augmentation théorique de la testostérone et la diminution du cortisol (catabolisant) circulant ce qui favoriserait la force musculaire. Comme l'exercice physique et la restriction calorique (déjà abordés), sont associés à une augmentation circulante et musculaire de DHEA [224] [225]. Ces observations suggèrent que les effets bénéfiques pourraient être médiés par cette hormone. Dans ce sens, en 2015 l'équipe de Hashimoto a décortiqué les effets de la DHEA sur les voies de signalisation intra-cellulaires de cellules musculaires en culture (C2C12). Le traitement n'a pas montré de phosphorylation d'Akt,

mais une activation de l'AMPK et une augmentation de l'expression de PGC1 α et de GLUT4 (transporteur au niveau du muscle squelettique, les événements ayant des effets « rajeunissants » glucose) dans les myotubes [226].

Une revue analysant 155 études testant la supplémentation en DHEA chez une population âgée (>50 ans) rapporte que quelque soit le paramètre étudié (masse ou fonction musculaire), les résultats ne permettent pas d'attribuer un réel effet bénéfique de la DHEA sur le muscle squelettique des personnes âgées [227]. Au cours des études montrant une amélioration de la force, l'apport de DHEA était combiné avec de l'exercice physique sans groupe contrôle ne faisant que de l'exercice, ne permettant pas d'en conclure un effet propre de la DHEA sur le muscle squelettique [227].

- **Testostérone**

Les stratégies basées sur des supplémentations en testostérone ont été considérablement augmentées durant les 10 dernières années. Cette augmentation est due en partie au vieillissement généralisé de la population présentant des pathologies comme le diabète, les atteintes cardiovasculaires et l'ostéoporose pour lesquelles de faibles taux de testostérone plasmatique ont pu être remarquées [228], [229]. Au niveau du muscle squelettique, les effets de la testostérone diffèrent selon la durée du traitement et la dose administrée [230]. En effet, les effets bénéfiques concernent la force, la puissance et la masse et semblent être médiés par l'activation des cellules satellites et la potentialisation de la synthèse protéique [231]. De plus, la testostérone, en se fixant sur son récepteur nucléaire, améliore la biogénèse mitochondriale musculaire ce qui se traduit à l'échelle de l'organisme par i) une augmentation de la dépense énergétique, ii) une diminution de la masse grasse et iii) une masse maigre plus importante [232]. Cependant, ces résultats sont à prendre avec précaution puisque la majorité de ces études ciblent une population de personnes âgées en bonne santé présentant un faible risque d'effets secondaires comme l'augmentation de l'hématocrite [233]. En effet, lorsque les études de supplémentation en testostérone ciblent des populations âgées fragiles présentant une grande susceptibilité aux comorbidités, les effets bénéfiques s'avèrent plus modérés et sont souvent associés à des effets secondaires importants comme les pathologies cardiovasculaires ou encore la survenue de cancer de la prostate [233]. Des études ciblant des populations fragiles ont dûes être

interrompues à cause de la survenue au cours du traitement d'anomalies cardiovasculaires, cutanées et lipodystrophies [234].

En raison de ces effets secondaires limitant l'utilisation de la testostérone et plus largement des androgènes la communauté scientifique s'intéresse à des ligands non stéroïdiens des récepteurs aux androgènes (RA). Ces molécules sont appelées SARMs (pour *Selective Androgen Receptor Modulators*) et ont vite évolué en SERMs (pour *Selective Estrogen Receptor modulators*), utilisés depuis 20 ans pour compenser la diminution des estrogènes circulantes au cours chez les femmes ménopausées [235].

- **Modulateurs sélectifs des récepteurs aux androgènes (SARMs)**

Les traitements à partir des SARMs ont émergé en raison de leur spécificité d'action associée à des effets secondaires modérés. Une étude récente, randomisée et menée en double-aveugle chez 170 femmes de plus de 65 ans sarcopéniques ou présentant des dysfonctions physiques modérées, montre une amélioration des performances physiques après un traitement de 6 mois au MK-0773 par rapport au groupe placebo [236]. Un autre SARM, le Gtx-24 (l'enobosarm), non stéroïdien, qui exerce des effets anabolisants spécifiquement au niveau du muscle squelettique et des os, provoque une augmentation de la masse maigre totale et des fonctions physiques sans effets secondaires sur la prostate ou la pousse des cheveux [237]. D'autres études sur les SARMs sont en cours et ils apparaissent comme étant une stratégie alternative aux agonistes des androgènes. De plus, une recherche importante sur la signalisation intracellulaire des androgènes ainsi que sur la modulation pharmacologique de ces agents permettra de mettre en place de nouvelles approches et de nouvelles molécules plus performantes.

c. Inhibiteurs des enzymes de conversion de l'Angiotensine (ACE)

L'enzyme de conversion de l'angiotensine aussi appelée ECA (ou ACE en anglais), appartient au système rénine-angiotensine et transforme l'angiotensine I en angiotensine II. Les inhibiteurs de cette enzyme comme l'énalapril® ou le losartan® (commercialisés par le laboratoire Mylan) sont couramment prescrits comme antihypertenseurs et sont donc communément utilisés dans les pathologies

cardiovasculaires. Cependant, certains travaux ont montrés qu'ils présentaient également des effets bénéfiques sur le muscle squelettique [238]. En effet, une étude observationnelle publiée dans *The Lancet* en 2002 révèle que l'utilisation à long-terme de ces molécules est associée à une diminution du déclin de masse et de force musculaire ainsi qu'à une amélioration de la vitesse de marche de sujets âgés hypertendus en comparaison à l'utilisation d'autres catégories d'antihypertenseurs [238]. Vraisemblablement, ces effets bénéfiques seraient médiés par différents paramètres comme l'amélioration de l'angiogénèse [239], l'augmentation des taux sérique d'IGF-1 [240] biogénèse mitochondriale (énalapril et losartan) [241] et la diminution de l'apoptose [242]. Cependant, il faut garder à l'esprit que des effets indirects et principalement cardiovasculaires de ces molécules sur la physiologie musculaire ne sont pas à exclure [243]. Des études plus approfondies sont attendues avant de recommander ces traitements contre la sarcopénie.

d. Les inhibiteurs de la Myostatine

La myostatine, ou facteur de croissance et de différenciation 8, appartient à la famille des TGF β . Il est un régulateur négatif de la masse musculaire. L'évolution des concentrations circulantes et d'expression génique de la myostatine avec l'âge n'est pas claire [137]. Cependant de nombreuses études ont testé l'utilisation des inhibiteurs de la myostatine pour augmenter la masse musculaire de sujets âgés. LeBrasseur et ses collaborateurs ont ainsi mis en évidence que le traitement de souris âgées par un anticorps anti-myostatine neutralisant (PF-354) pendant 1 mois à la dose de 24mg/kg entraînait une augmentation de la masse musculaire (+12%), associée à une amélioration des performances physiques évaluées sur tapis roulant [244]. Ces effets sont associés à une augmentation de l'activation de PGC1 α , une diminution de la phosphorylation de Smad3 et de Murf-1, tous deux impliqués dans la voie de dégradation protéique dépendante du protéasome. Enfin, ces expériences ont également permis de montrer que le traitement entraînait une diminution drastique (56%) des marqueurs de l'apoptose tels que la caspase 3 et une augmentation de l'activité des enzymes antioxydantes comme la SDH [244] [245]. Ces résultats sont encourageants et permettent d'envisager dans un futur proche l'utilisation d'inhibiteurs directs de la myostatine dans le traitement de la sarcopénie.

e. Les activateurs pharmacologiques de PGC1 α

Il existe des composés exogènes capables de mimer un exercice physique en activant des facteurs de transcription impliqués dans les voies de synthèse musculaire comme les PPAR β/δ (recepteur activé par les proliférateurs des peroxyosomes) ou PGC1 α (coactivateur des PPAR). En 2008, un article publié dans la revue *Cell* par l'équipe d'Evans a montré que l'AICAR (5-Aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide) possédait la capacité d'activer des voies AMPK-dépendantes qui conduisaient à l'activation de ces facteurs de transcription améliorant nettement les performances physiques des animaux traités [246]. Par ailleurs, le laboratoire britannique Glaxo Smith Kline a développé de nouvelles molécules activatrices de l'AMPK, dont le GW1516, capables d'améliorer les performances de 68% des animaux par une voie dépendante de PPAR δ . Les études des effets bénéfiques de l'AICAR sur les rongeurs dans des contextes physiopathologiques comme les cancers, la cognition, ainsi que dans le vieillissement musculaire sont encore d'actualité.

En parallèle, de nombreuses études se sont intéressées aux rôles de la mitochondrie et ont permis l'identification de nouveaux cadres ouverts de lecture codant pour des peptides. En mars 2015 l'équipe de Pinchas Cohen publie dans *Cell Metabolism* la découverte du MOTS-c (pour mitochondrial *open reading frame of the 12S rRNA-c*) qui aurait pour cible principale le muscle squelettique et inhiberait le cycle folate et la biosynthèse *de novo* de purine qui lui est associée. Ceci mène à l'activation de l'AMPK [247]. Dans le même numéro, un *preview* annonce que le MOTS-c en question est capable d'activer l'AMPK, ce qui offre une option thérapeutique nouvelle pour retarder le vieillissement et améliorer les conditions de vie [248].

Pour conclure, l'analyse bibliographique sur le sujet montre que les approches nutritionnelles sont généralement couplées à l'exercice physique afin de potentialiser son effet et d'alléger l'intervention sur les personnes âgées comme mentionné précédemment. Par ailleurs, il reste important de pouvoir proposer des alternatives moins lourdes mais tout aussi efficaces telles que les approches pharmacologiques vers quoi tend la recherche médicale sur le sujet actuellement.

Partie IV

Le couple APELINE/APJ

A] Découverte et structure

En 1998, lorsque l'équipe de Tatemoto recherche des ligands endogènes au récepteur orphelin APJ, elle met en évidence l'apeline, pour **APJ-Endogen Ligan**, un peptide endogène circulant se présentant sous différentes formes.

1/ APJ

Le récepteur APJ est un récepteur à 7 domaines transmembranaires couplé à une protéine $G_{i/o}$ (RCPG). Le gène qui code pour cette protéine de 380 acides aminés (**figure 25**) est localisé sur la bande q12 du chromosome 11 chez l'homme [249]. Ce récepteur présente une forte homologie avec le récepteur à l'angiotensine (ATR), sans pour autant pouvoir lier l'angiotensine II séquence du récepteur. Enfin, l'identification d'APJ chez un grand nombre d'espèces telles que les rongeurs, la vache, le macaque, le xénope, le poisson zèbre et l'homme montre la conservation et l'importance du système apeline/APJ [250], [251].

		TM1	
Human	1	MEEGGDFDNY YGADNQSECE YTDWKS	SSGAL IPAIYMLVFL LGTTGNGLVL 50
Rat	1	MEDDG-Y-NY YGADNQSECD YADWTP	SSGAL IPAIYMLVFL LGTTGNGLVL 48
		TM2	
Human	51	WTVFRSSREK RRSADIFIAS LAVADLTFVV TLPLWATYTY R	RDYDWPFGTF 100
Rat	49	WTVFRSSREK RRSADIFIAS LAVADLTFVV TLPLWATYTY R	REFDWPFGTF 98
		TM3	
Human	101	FCKLSSYLIF VNMYASVFCL TGLSFDRYLA IVRPVANARL RLRVSGAVAT	150
Rat	99	SCKLSSYLIF VNMYASVFCL TGLSFDRYLA IVRPVANARL RLRVSGAVAT	148
		TM4	
Human	151	AVLWVLAALL AMPVMVLRIT GDLENTTKVQ CYMDYSMVAT VSSEWAVEVG	200
Rat	149	AVLWVLAALL AMPVMVFRST DIPENSTKTQ CYMDYSMVAT SNSEWAVEVG	198
		TM5	
Human	201	LGVSSTVVG FVVPFTIIMLTC YFFIAQTIAG HFRKERIEGL RKRRRLLSII	250
Rat	199	LGVSSTVVG FVVPFTIIMLTC YFFIAQTIAG HFRKERIEGL RKRRRLLSII	248
		TM6	TM7
Human	251	VVLVVTFALC WMPYHLVKTL YMLGSL LHWP CDFDL FLMNI	FPYCTCISYV 300
Rat	249	VVLVVTFALC WMPYHLVKTL YMLGNL LHWP CDFDL FLMNV	FPYCTCISYV 298
Human	301	NSCLNPFLYA FFDPRFRQAC TSMGCCQSR CAGTSHSSSG	EKSASYSSGH 350
Rat	299	NSCLNPFLYA FFDPRFRQAC TSMCCDQSG CKGSPHSSSA	EKSASYSSGH 348
Human	351	SQGPQPNMCK GGEQMHKESI PYSQETLVVD	380
Rat	349	SQGPQPNMCK GGEPMHKESI PYSQETLVVD	377

Figure 25 : Séquence du récepteur APJ de l'homme et du rat [252]

2/ Apeline

L'apeline est un peptide retrouvé sous différentes isoformes, codé par le gène du même nom localisé sur le chromosome X [253]. Le peptide est issu du clivage intracellulaire de la **préproapeline**, précurseur de 77 acides aminés [253]. La partie N-terminale de cette protéine est riche en acides aminés hydrophobes correspondant à une séquence signal de sécrétion. Un premier clivage de la préproapeline par des endopeptidases au niveau de l'acide aminé 22 génère un intermédiaire de 55 acides aminés nommé **proapeline** qui va subir à son tour une succession de clivages au niveau des sites hydrophobes menant aux formes biologiquement actives retrouvées dans la

circulation sanguine que sont **l'apeline-36, 17 et 13** (dépendant du nombre d'acides aminés qui la composent) [254]. La pyroglutamination de l'apeline-13, évènement post-traductionnel fréquent sur les protéines endogènes, permet de stabiliser l'apeline et de la protéger contre une dégradation par les peptidases (**tableau 2**) [255]. L'apeline est le premier ligand du récepteur APJ qui a été découvert [254] mais depuis quelques années **un autre agoniste d'APJ** a été mis en évidence (voir encadré) [256] [257] [258].

Apela/Elabela/Toddler: Très récemment, une forte homologie a pu être mise en évidence entre le peptide apela (pour **APJ early endogenous ligand** aussi nommé *elabela* ou *Toddler*) et l'apeline. En effet, comme l'apeline, apela possède des sites de clivages permettant la génération de différentes isoformes d'apela (11 et 22 acides aminés à partir d'une forme commune de 32 acides aminés) qui se fixent sur le récepteur APJ et induisent son internalisation. Comme l'apeline (détaillé plus bas), apela active des voies intracellulaires dépendantes de Gi comme les protéines ERK et son injection icv est associée à une stimulation de la diurèse et de la prise hydrique. Très récemment étudié, apela semble avoir un rôle primordial dans la régulation du développement cardiaque et la gastrulation pendant l'embryogénèse puisque le poisson zèbre mutant pour le récepteur APJ présente le même phénotype que le mutant pour apela.

PEPTIDE	SEQUENCE D'ACIDES AMINES
Apeline-36	LVQPRGRSGPGPWQGGRRKFRQRPRLSHKGMPF
Apeline-17	KFRQRPRLSHKGMPF
Apeline-13	QRPRLSHKGMPF
[Pyr]-Apeline-13	pERPRLSHKGMPF

Tableau 2 : Séquences d'acides aminés des différentes d'apeline générées à partir de la préproapeline 77.

B] Localisations et régulation du complexe Apeline/APJ

1/ Localisations

Une des spécificités du couple apeline/APJ est la fréquente co-expression des deux molécules par le même tissu. Ainsi, au niveau central, le couple récepteur/ligand est retrouvé dans de nombreuses structures comme l'hypothalamus (le noyau supra-optique et paraventriculaire) et l'hippocampe, centre de la mémoire [253] [259]. Au niveau périphérique, la majorité des tissus co expriment également les deux molécules avec des taux particulièrement élevés retrouvés dans les reins, les poumons, la glande mammaire ou encore les tissu cardiovasculaires (cœur et vaisseaux) (**figure 26**). La **figure 26** nous montre qu'une expression d'APJ est rétrouvée dans le muscle squelettique.

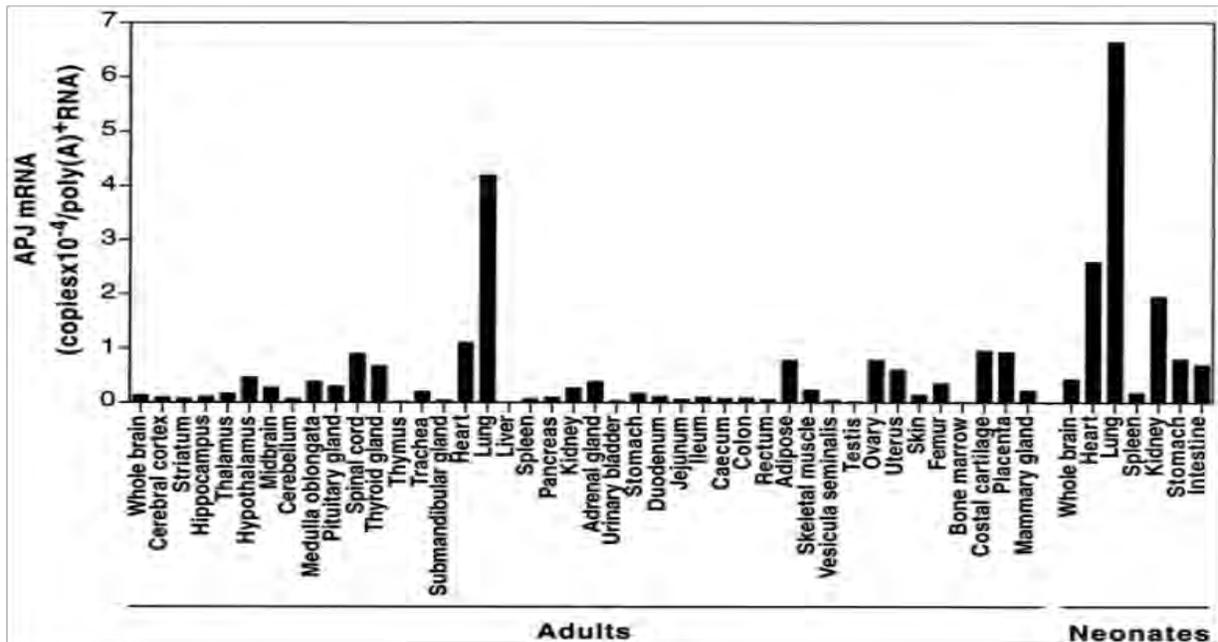


Figure 26 : Expression génique du récepteur APJ dans différents tissus chez l'homme [252]

Les isoformes de l'apeline sont exprimés différenciellement selon le tissu. Par exemple, la forme (pyr)-apelin-13 est majoritairement représentée au niveau du cœur [260] et du cerveau alors que la forme 36 est préférentiellement retrouvée dans les poumons. Au contraire, dans l'utérus et les glandes mammaires, les deux formes sont exprimées de façon équivalente [261]. Parmi les endopeptidases responsables de la maturation de l'apeline, Shin *et al.* ont identifié la subtilisin/kexin type 3 (PCSK3) qui clive la proapeline

directement en apeline-13 [262]. La répartition tissulaire des différentes formes d'apeline pourrait ainsi s'expliquer par l'expression des endopeptidases spécifiques dans certains tissus. Ainsi au niveau du tissu adipeux, l'expression majoritaire de la forme 13 est associée à une expression importante de la PCSK3 (dans un contexte d'obésité) [262]. En terme de sécrétion de l'apeline très peu de choses de connues et seul notre laboratoire a pu mettre en évidence une activité de sécrétion du peptide par l'adipocyte et la cellule musculaire *in vitro* [263] [264].

Au niveau plasmatique, l'apeline 17 et (pyr)-13 sont prédominantes [265]. Les taux circulants de la totalité des formes de l'apeline sont évalués à 3.76 ng/ml chez les humains adultes en bonne santé [266].

2/ Voies de signalisation intra cellulaires activées par APJ

L'activation du récepteur APJ a été associée à de nombreuses voies de signalisation intracellulaires, cependant, nous ne mentionnerons que celles qui apparaissent potentiellement intéressantes dans le contexte du vieillissement musculaire. L'activation d'APJ par l'apeline entraîne le recrutement à la membrane de la β arrestine qui conduit à la désensibilisation du récepteur et à son internalisation dépendante des clathrines [267] (**figure 26**). Une fois internalisé, APJ peut alors activer différentes voies de signalisation comme les MAPKs, l'AMPK, le complexe PI3K/Akt ou encore la eNOS, de façon β arrestine dépendante [268].

Voies des MAPK- Selon le type cellulaire, APJ peut être couplé à une protéine $G_{i/o}$ (ou $G_{q/11}$ et G_{13} dans certains cas) qui, une fois activée, inhibe la production d'AMPc et stimule la voie des MAPKs par la phosphorylation de ERK-1 et ERK-2 [269] conduisant *in vitro* à la stimulation de la prolifération, de la survie et de la migration des cellules.

Voies impliquées dans la régulation métabolique de la cellule- Notre laboratoire et d'autres équipes de recherche par la suite ont pu montrer que la liaison de l'apeline sur APJ permettait d'activer les voies **Pi3K/Akt** et **l'AMPK** [270] [271]. Nous avons pu montrer grâce à des modèles *in vitro* et *in vivo* complémentaires que cette activation au niveau musculaire entraînait une stimulation des fonctions métaboliques (**figure 26**) (détaillé plus loin). De plus, l'activation *in vitro* des voies Pi3K/Akt et MAPKs (via MEK et ERK1/2) par le système apeline/APJ conduit à la phosphorylation sur deux résidus

thréonine et un résidu sérine de la protéine **P70S6K** dans des lignée de cellules endothéliales [272]. Au niveau endothélial et musculaire, l'apeline est capable d'activer la synthèse d'oxyde nitrique endothéliale (**eNOS**) ainsi que la **PLC** (Phospholipase C). En plus de la fixation des ligands apeline et apela, le stress mécanique est également capable d'induire l'activation d'APJ [273]. En effet, comme démontré *in vitro* et *in vivo* par Scimia et ses collaborateurs, l'étirement mécanique de cellules cardiaques entraîne une hypertrophie des cellules induites par la stimulation de la voie β arrestine et indépendante de toute présence d'un potentiel ligand d'APJ [273].

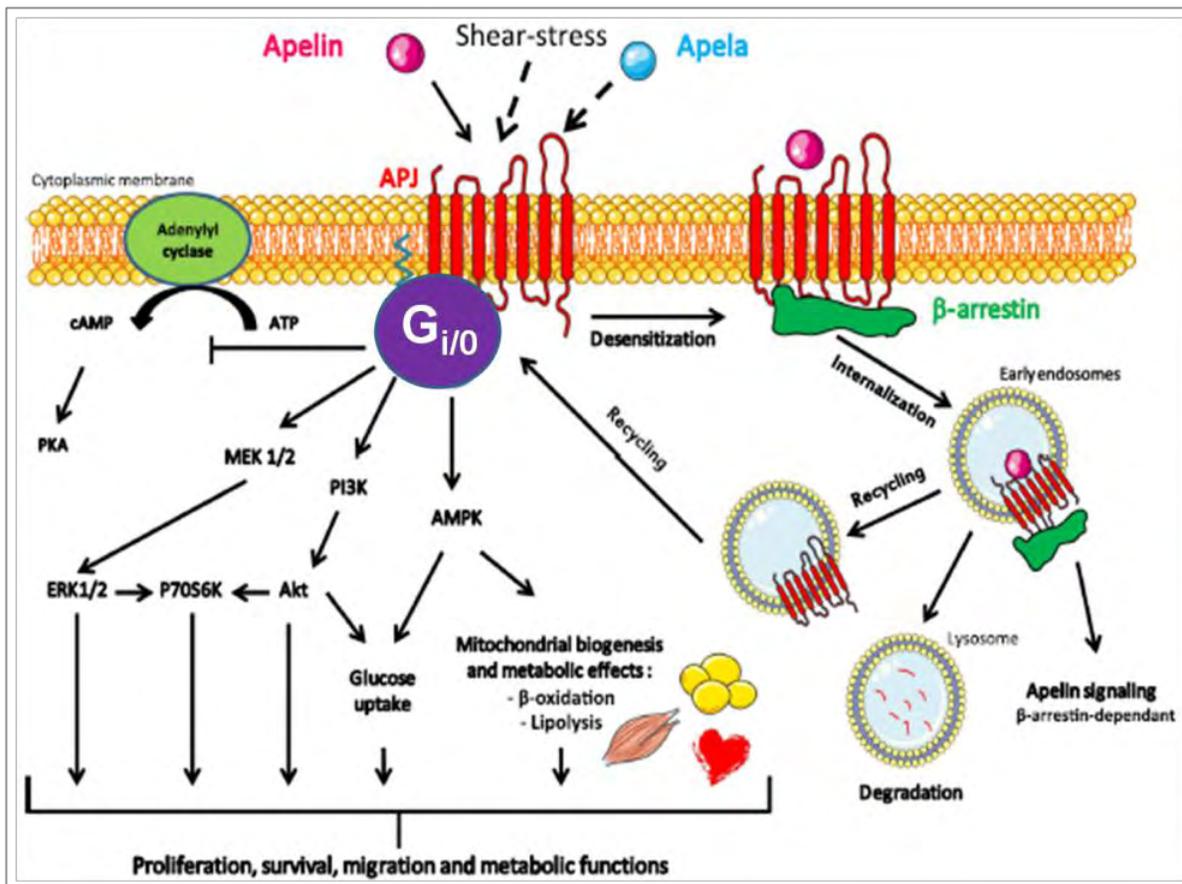


Figure 27: Voies de signalisation activées par APJ [274]

3/ Régulation

Le couple Apeline/APJ est régulé au cours de phénomènes physiologiques comme le stress hydrique ou les contraintes cardiovasculaires mais également au cours de pathologies comme les insuffisances cardiaques, l'obésité ou le diabète.

- **APJ**

Plusieurs équipes, qui se sont intéressées aux effets biologiques transmis par APJ, ont parallèlement étudié la régulation de ce récepteur. C'est le cas par exemple de O'Caroll et de ses collaborateurs qui ont pu observer que des variations de l'osmolarité pouvaient réguler l'expression d'APJ dans le Noyau Para Ventriculaire ainsi que dans le Noyau Supra Optique de rat [275]. En effet, une charge de sodium (présent dans l'eau de boisson) ou une déprivation en eau de 48h pratiquée chez des rats entraîne une forte augmentation (jusqu'à 8 fois) du niveau d'expression d'APJ au niveau du SNC. De plus, les neurones parvocellulaires constituant le Noyau Para Ventriculaire présentent aussi une expression d'APJ augmentée lorsque les rats étaient soumis à un stress hydrique.

Agent ou facteur	Effet	Modèle	Référence
Osmoticité	+ (ARNm)	SNC rat	O'Caroll et al, 2003
Stress	+(ARNm)	SNC rat	O'Caroll et al, 2003
NO/L-Arginine	+(ARNm et protéine)	SNC rat	Bai et al., 2007
Vasculogénèse	+(protéine)	Vaisseaux rétine souris	Saint-Geniez et al., 2003
Insuffisance cardiaque	+(ARNm et protéine)	Coeur homme	Chen et al., 2003
Insuffisance cardiaque chronique	-(ARNm)	Atrium et ventricule humain	Foldes et al., 2003
Diabète	-(ARNm et protéine)	Aortes de souris db/db	Zhong et al., 2007
Hypertension	-(Protéine)	Coeur et aorte de rat hypertendus (SHR)	Zhong et al., 2005 et 2006
Ligand APJ	- (Protéine)	Rats obèses	Clarke et al., 2008

Table 3 : Tableau résumant les différents agents ou facteurs pouvant réguler positivement ou négativement l'expression de l'ARNm ou de la protéine d'APJ

D'autres régulations ont été démontrées comme par exemple l'effet positif d'une adrenalectomie chez le rat sur l'expression d'APJ, signifiant que les glucocorticoïdes endogènes inhibent l'expression du récepteur au niveau central. Plus récemment, une étude menée chez le rat rendu obèse par un régime riche en lipides, a pu mettre en évidence que ces animaux présentaient une augmentation de l'expression d'APJ hypothalamique. De plus, dans cette même étude, les auteurs démontrent que l'apeline, injectée par voie intracérébro-ventriculaire à ces animaux, entraîne une diminution de

l'expression du récepteur [276]. L'équipe de Howell a mis en évidence dans d'autres systèmes une régulation complexe du promoteur du gène codant pour APJ par Sp1, C/EBP, les estrogènes ou encore les glucocorticoïdes [277]. Cette régulation semble également dépendante de l'AMPc cellulaire, modulée par la forskoline sur des neurones en culture [277]. D'autres types de régulations ont pu être mises en évidence depuis le début des années 2000 et sont répertoriées dans le **tableau 3**.

- **Apeline**

L'activité de l'apeline peut être régulée tout d'abord au niveau plasmatique. En effet, comme l'angiotensine II et la dynorphine A, l'apeline est la cible de l'ACE2 (*Angiotensin converting Enzyme 2*). Il s'agit d'une carboxypeptidase capable de cliver la phénylalanine en position C-terminale de différents peptides dont l'apeline [278]. Cet acide aminé apparaît essentiel pour permettre le recrutement de la β arrestine et l'internalisation du récepteur APJ comme démontré par l'inhibition de cette voie suite à la fixation de la forme tronquée de l'apeline 17 (appelée apelin-K16P) [279]. Ainsi, le clivage de l'apeline par l'ACE2 génère un agoniste biaisé du récepteur qui favorise une signalisation dépendante de la protéine Gi par rapport à la β arrestine [279]. Il est à noter que l'apeline régule positivement l'expression de l'ACE2, puisque l'enzyme est diminuée chez les souris déficientes en apeline [280]. De plus, la substitution de la phénylalanine terminale par une alanine inhibe totalement les effets de l'apeline sur les cellules CHO transfectées (pour *Chinese Hamster Ovary*) [281]. Le peptide ainsi modifié, appelé F13A, est utilisé comme un antagoniste du récepteur puisque sa fixation n'induit pas de signalisation en aval.

La participation des différents tissus à l'apeline plasmatique n'est pas connue mais notre équipe a pu mettre en évidence que l'adipocyte (3T3 et adipocyte murin et humain isolé) et le myocyte (C2C12) étaient capables de sécréter le peptide [263] [264]. Ainsi, **l'apeline peut être considérée comme une adipokine et une myokine**. En termes de régulation, l'équipe a également montré que l'insuline contrôlait positivement l'expression et la sécrétion de l'apeline adipocytaire [263]. Ce résultat a permis de mettre en évidence qu'au cours d'une obésité associée à une hyperinsulinémie, les taux plasmatique et adipocytaire d'apeline étaient significativement élevés [263]. Cette relation avec l'insulinémie a aussi permis de montrer la relation qui pouvait exister entre apeline et période de jeune alimentaire et d'alimentation.

L'insuffisance cardiaque est également associée à des modifications de l'apeline tissulaire (cardiaque) et circulante [282], [283] qui seront abordées plus loin dans ce manuscrit. L'hypoxie induite par l'HIF1- α (*Hypoxia-Inducible Factor 1 α*) sur des cellules endothéliales en culture s'accompagne d'une augmentation de l'expression du ligand [284]. Enfin, au cours d'une récente étude, nous avons pu montrer que la pratique d'un exercice physique chronique chez des individus obèses permettait d'augmenter le transcrite de l'apeline dans le muscle strié squelettique [285]. Cet effet de l'exercice physique sur les taux musculaires d'apeline au cours de l'obésité a également été retrouvé par la suite chez le rat [286].

De façon intéressante, dans les différentes situations pathologiques étudiées, l'apeline semble augmentée. Or en 2014, l'équipe de Choe a montré qu'au cours du stress du réticulum endoplasmique, ATF4 est capable de réguler négativement le promoteur de l'apeline conduisant à la diminution de son expression ce qui contribuerait à l'effet pro-apoptotique dépendant de la p38MAPK [287].

D] Rôles

1/ Cardiovasculaires

a. Effets

L'apeline est reconnue depuis plus de 10 ans comme un puissant agent inotrope positif. En effet, elle est capable d'augmenter la contractilité des cellules cardiaques *in vitro* et *in vivo* [288]. En liant APJ sur les cardiomyocytes, l'apeline active la PLC (Phospholipase C) ce qui a pour conséquence d'augmenter les taux intracellulaires de diacylglycérol permettant de stimuler la PKC, elle-même responsable de l'entrée de Ca^{2+} dans la cellule permettant la contraction [288]. Il est intéressant de noter que dans ce contexte le récepteur est couplé à une protéine Gq. Par ailleurs, les souris déficientes en apeline (Apln^{-/-}) développent une insuffisance cardiaque lorsqu'elles sont âgées, pointant l'apeline comme nécessaire au maintien de la fonction cardiaque [289].

Au niveau endothélial, l'apeline joue le rôle d'un puissant vasodilatateur permettant, à l'échelle d'un organisme entier de diminuer la pression artérielle [290]. Cet effet est assuré par l'activation de la protéine eNOS (*endothelial Nitric Oxide Synthase*)

présente dans les cellules endothéliales des vaisseaux et produisant du monoxyde d'azote (NO). Par effet paracrine, le NO va agir sur les cellules musculaires lisses entourant les vaisseaux et induire une relaxation musculaire *via* la stimulation de la guanylyl cyclase et de son second messenger, le GMPc [290]. Ce rôle a pu être mis en évidence chez l'homme où l'injection intra-veineuse d'apeline (13 et 36) dans l'avant-bras, provoque une vasodilatation dans les vaisseaux du bras controlatéral dépendante du NO [291].

b. Régulation/pathologie

Au cours de l'insuffisance cardiaque (IC), le système apeline/APJ présente une évolution biphasique. En effet, plusieurs études montrent que l'expression cardiaque du récepteur et de son ligand est stable ou augmentée dans les stades précoces de l'IC (appelée IC compensée) alors qu'elle décline dans les phases tardives (appelées IC décompensée) [283] [266]. Au cours de l'ischémie cardiaque (première cause de l'IC), l'HIF-1 est transloqué au noyau, entraînant l'augmentation de l'expression de l'ARNm de l'apeline dans les cardiomyocytes [284]. Au cours des phases tardives des pathologies cardiaques, le système-rénine-angiotensine (vasoconstricteur) est activé, entraînant avec lui l'augmentation de l'ACE2 et potentiellement la diminution de l'activité de l'apeline [283]. L'apeline présente également un rôle de protection contre les phénomènes d'ischémie-reperfusion (par exemple au cours d'un infarctus). Dans un modèle d'infarctus murin, le traitement à l'apeline pendant l'ischémie-reperfusion entraîne une diminution de la taille de la zone touchée ainsi qu'une amélioration de la récupération post-lésion [292]. Dans ce contexte, les effets de l'apeline sont dépendants de l'activation de la voie Pi3K/Akt, responsable de l'activation de l'eNOS [293]. D'autre part, l'effet protecteur de l'apeline peut également être indépendant de la synthèse de NO. En effet l'activation d'APJ par l'apeline peut conduire à l'activation de la voie ERK1/2 (MAPK), inhibitrice des protéines pro-apoptotique Bax/Bad, ce qui permet le maintien de l'imperméabilité du pore de transition mitochondriale mPTP [294]. Ainsi l'effet protecteur de l'apeline sur le cœur pourrait être associé à une inhibition de l'apoptose.

2/ Angiogénèse

En plus de son pouvoir vasodilatateur et inotrope positif, le peptide présente un fort potentiel angiogénique. Par l'activation de la voie ERK, la liaison de l'apeline sur son récepteur entraîne la prolifération de lignée de cellules endothéliales en culture [272]. De part cet effet, l'apeline est un agent potentiellement pro-tumorigénique dont l'expression est augmentée dans certains cancers humains. Antagoniser APJ est proposé comme possible stratégie anticancéreuse puisque l'on sait qu'APJ est surexprimé au cours de la formation des vaisseaux au cours de la tumorigénèse [295] [296].

3/ Système Nerveux Central (SNC)

Comme déjà évoqué, le couple Apeline/APJ est exprimé dans de nombreuses structures du SNC comme l'hypothalamus, le noyau supra-optique, le noyau arqué et l'hippocampe. La présence du couple dans le cerveau a été associée à des effets de contrôle de la prise hydrique et alimentaire mais aussi des actions potentiellement neuroprotectrices et mnésiques.

a. prise hydrique et alimentaire

- **Prise alimentaire**

Bien que le couple apeline/APJ soit exprimé dans les neurones à **POMC** anorexigènes, son rôle dans la prise alimentaire est peu clair. Il apparait des discordances dans les effets selon l'état nutritionnel (nourris ou à jeun) [276] et métabolique (normo pondéral ou obèse) des animaux [297] [298] ou encore selon le mode d'injection (icv ou périphérique) et la dose utilisée [298] [271]. Ainsi l'injection intracérébroventriculaire d'apeline-13 (pyr) n'a pas d'effet sur la prise alimentaire d'animaux nourris [297], tandis que dans une période de jeûne, elle est augmentée de façon dose-dépendante dans l'étude de Taheri et ses collaborateurs [299]. Cependant l'effet satiétogène de l'apeline sur la est faible et il est obtenu à partir de fortes dose

POMC : Pro-Opio Mélano Cortine, neurotransmetteurs à la base du système mélanocortine favorisant le catabolisme et les dépenses énergétiques.

d'apeline. Ceci suggère que la régulation de la prise alimentaire n'est pas un rôle central majeur de l'apeline [299].

- **Prise hydrique**

Dans la région hypothalamique, l'apeline co-localise avec la vasopressine (l'hormone anti-diurétique) et diminue sa synthèse [300] [301]. En effet, l'équipe de Catherine Llorens-Cortes a montré qu'une injection intracérébroventriculaire d'apeline diminue les taux circulants de vasopressine et par conséquent, favorise la diurèse et augmente la prise hydrique des rats [300] [299]. Par ailleurs, comme nous l'avons déjà évoqué, la privation d'eau entraîne une augmentation de l'apeline centrale et une diminution de l'AVP, or l'utilisation d'antagoniste des récepteurs à l'AVP réprime la régulation de l'apeline en réponse à la déshydratation chez le rat [302]. Autrement dit, l'injection icv d'AVP mime la déshydratation et entraîne l'augmentation de l'expression de l'apeline au niveau hypothalamique, montrant une régulation croisée entre les deux peptides, participant à la régulation de la prise hydrique [302].

La vasopressine, aussi appelée AVP ou ADH, est une hormone peptidique anti-diurétique, synthétisée au niveau des noyaux supra-optiques et paraventriculaires de l'hypothalamus. Son rôle principal se joue au niveau du rein, où elle stimule une réabsorption d'eau.

b. Neuroprotection

Des neurones mis en culture et traités à l'apeline (apelin 13 et/ou 36 à 20 $\mu\text{mol/L}$) présentent une activation des voies Akt et ERK, impliquées dans la survie cellulaire. Sur ces bases, il a pu être montré que le couple apeline/APJ présentait un rôle neuroprotecteur notamment contre la toxicité du virus HIV au niveau des neurones du cortex et hippocampiques [259] [303]. Plus récemment, l'équipe de Litao a analysé *in vivo* l'effet neuroprotecteur de l'apeline-13 grâce à un modèle d'ischémie/reperfusion cérébrale chez la souris. Ces animaux ayant reçu une injection intracérébroventriculaire d'apeline présentaient une atténuation du déficit neuronal, de l'œdème cérébral et du nombre de cellules en apoptose [286]. Les effets neuroprotecteurs observés sont dépendants des voies Pi3K/Akt et ERK en partie médiés par la suppression de l'inflammation suggérant un rôle potentiel de l'apeline comme anti-neuroinflammatoire [286].

c. Antalgique

Un effet antalgique a également été attribué à l'apeline cérébrale. En effet, l'expression du peptide a été retrouvée dans des zones participant à la sensation de douleur, appelée nociception, comme les amygdales, l'hypothalamus et le noyau dorsal de raphé. Ainsi l'injection intracérébroventriculaire d'apeline-13 (0.3, 0.5, 0.8 and 3 µg/souris) diminue significativement la nociception des souris soumises à une douleur viscérale de façon dose-dépendante [304]. Cet effet apparaît dépendant du récepteur APJ (antagonisé par l'injection de F13A) et des récepteurs aux opioïdes μ 1 [304]. De plus, l'injection d'apeline potentialise les effets de la morphine. Cette étude permet d'émettre l'hypothèse que l'apeline-13 centrale pourrait entraîner la libération d'opioïdes endogènes [304].

4/ Métabolisme

Toutes les études portant sur l'apeline et le muscle squelettique ont été réalisées dans un contexte de diabète de type II induit par une obésité. La majorité est notamment issue de notre équipe qui a montré au cours des 10 dernières années que l'apeline pouvait être une nouvelle stratégie thérapeutique anti-diabétique. Cette propriété antidiabétique de l'apeline fait actuellement l'objet d'essais cliniques

a. Métabolisme du glucose

L'apeline régule le métabolisme du glucose par 2 grands axes : l'absorption intestinale et l'utilisation par les tissus périphériques, majoritairement représentés par le tissu adipeux et musculaire.

Premièrement, notre équipe a mis en évidence l'existence d'une boucle de contrôle entre l'apeline et l'absorption intestinale de glucose [305].

En effet, dans un cycle de régulation, le glucose qui arrive au niveau des premiers segments de l'intestin stimule la sécrétion de [pyr]-apeline-13 par les entérocytes et par effet auto ou paracrine, l'apeline neosynthétisée va augmenter de transport de glucose dépendant de GLUT2 et SGLT1 (transporteurs du glucose) à travers la barrière

épithéliale de l'intestin [305]. Ces effets apparaissent possible grâce à la phosphorylation de l'AMPK de l'entérocyte [155]. Le résultat de ces effets sera une augmentation des taux de glucose dans la veine porte.

En explorant le rôle de l'apeline dans la régulation des flux métaboliques, notre équipe a également pu montrer en 2008 que l'injection intra-veineuse d'apeline chez des souris saines et obèses diabétiques insulino-résistantes améliore l'utilisation du glucose [270]. En effet, l'injection d'apeline au cours d'un test de tolérance au glucose a permis de mettre en évidence un effet bénéfique de l'apeline permettant d'améliorer la tolérance au glucose. De plus, des **clamps euglycémiques hyperinsulinémiques** ont mis en évidence que l'apeline possédait un effet additif à celui de l'insuline et ciblait préférentiellement le muscle strié squelettique. Ces effets sont dépendants d'une activation de l'AMPK, d'Akt et de la eNOS [270]. En effet, la phosphorylation de l'AMPK apparaît nécessaire aux effets de l'apeline sur le transport de glucose puisqu'ils sont abolis chez des souris transgéniques possédant une AMPK musculaire inactive (AMPK-dominant négatif) [270].

Clamp euglycémique, hyperinsulinémique : du glucose marquée (D-3[H] glucose est perfusé constamment en veine fémorale. L'insuline est perfusée de manière à maintenir constante la glycémie et dépend de l'efficacité de l'utilisation du glucose. La quantité d'insuline nécessaire au maintien de la glycémie est proportionnelle à l'utilisation du glucose par les cellules.

b. Métabolisme des lipides

Des souris obèses diabétiques ont été traitées quotidiennement par l'injection intra-péritonéale d'apeline pendant 28 jours à la dose de 0.5 $\mu\text{mol/kg/jour}$ [271]. A l'échelle de l'organisme, ce traitement entraîne une augmentation de l'oxydation des lipides (coefficient respiratoire mesuré par calorimétrie indirecte), de la tolérance au glucose et de la sensibilité à l'insuline [271]. De façon intéressante, l'apeline cible en particulier les mitochondries du muscle squelettique (soleus) en augmentant leur biosynthèse, illustrée par l'augmentation du nombre de copie de l'ADN mitochondrial, de l'activité citrate synthase et de l'expression protéique des complexes de la chaîne respiratoire [271]. Ces effets sont médiés par une stimulation des facteurs pro-mitochondriogéniques tels que PGC-1 α , NRF-1 et TFAM [271]. Enfin la phosphorylation

de l'AMPK est nécessaire aux effets bénéfiques de l'apeline sur les mitochondries puisqu'ils sont encore une fois totalement abolis chez les souris AMPK-DN. Par ailleurs, le co-traitement des souris par le F13A (antagoniste d'APJ, déjà mentionné) et l'apeline bloque les effets du peptide endogène montrant bien que les effets observés sont spécifiques de l'activation du récepteur APJ [271]. Les effets de l'apeline sur un muscle squelettique de souris obèses sont résumés dans la **figure 27**.

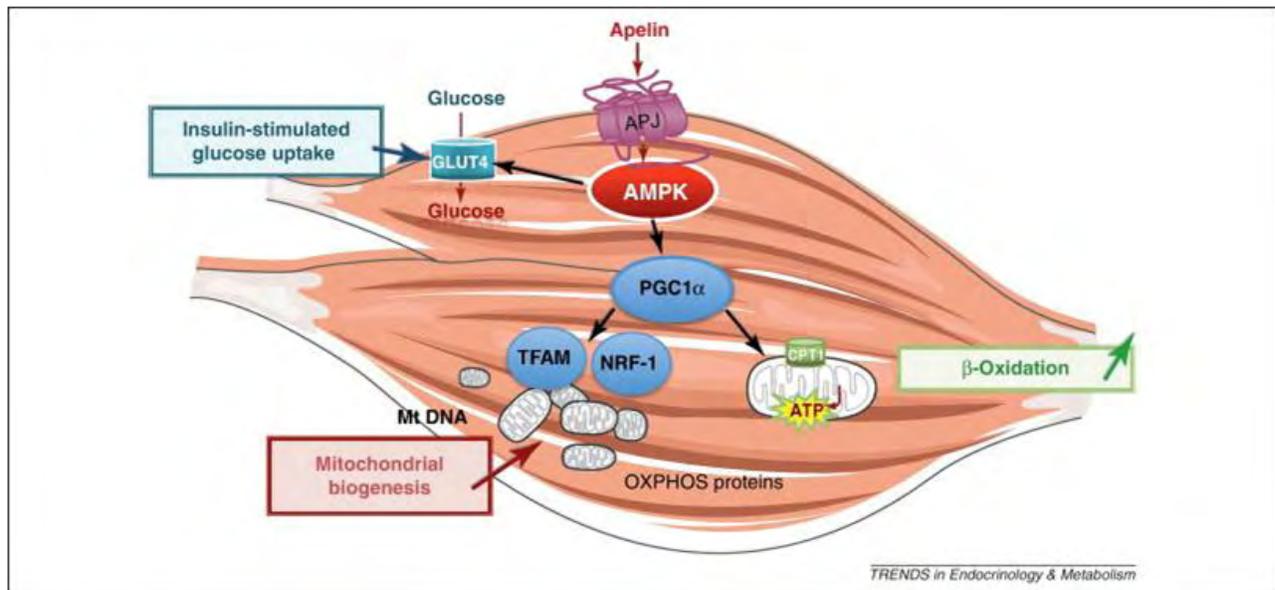


Figure 27 : Rôle de l'apeline dans le muscle squelettique de souris obèses [306]

Parallèlement à ces résultats, l'équipe de Massaki a généré une souris transgénique surexprimant l'apeline. Ces animaux présentent une résistance à l'obésité partiellement expliquée par une augmentation de la mitochondriogénèse au niveau musculaire [307]. La surexpression de l'apeline dans le muscle squelettique entraîne une augmentation de la surface des cellules endothéliales (en accord avec une vasodilatation et une amélioration de l'utilisation du glucose) ainsi qu'une augmentation des fibres de type I oxydatives bien que les causes de ces modifications ne soient pas maîtrisées [307].

RESULTATS EXPERIMENTAUX

PARTIE V

Travaux de these

Au début de mon doctorat, l'apeline n'avait encore jamais été étudiée dans le cadre du vieillissement. Ainsi, une période de mise au point a été nécessaire compte tenu de l'aspect novateur de la thématique du vieillissement dans le laboratoire. Les effets métaboliques de l'apeline avaient été mis en évidence dans le muscle squelettique et mon équipe d'accueil s'intéressait aux potentiels effets de ce peptide dans des pathologies associées à une altération métabolique. L'introduction de ce manuscrit montre que le vieillissement en général, et la sarcopénie en particulier, sont des événements intimement liés à des perturbations métaboliques. C'est ainsi que mon projet de thèse s'est articulé autour de deux axes :

1/ La régulation du système apelinergique dans la physiologie musculaire et son évolution au cours du vieillissement.

2/ Le rôle de l'apeline et les effets d'une supplémentation au cours du vieillissement musculaire.

Par ailleurs, des travaux collaboratifs nous ont conduits à nous interroger sur l'effet potentiel d'une supplémentation en apeline au cours du vieillissement ciblant d'autres tissus que le muscle comme par exemple le cerveau ou le rein. Dans ce manuscrit, seuls les travaux portant sur les troubles cognitifs post-opératoires (TCPO) seront abordés *via* deux questions :

1/ Un traitement à l'apeline permet-il de prévenir ou de réverser les TCPO chez des souris jeunes et âgées ?

2/ Comment l'apeline centrale et périphérique est-elle régulation au cours d'un TCPO chez la souris et chez l'homme ?

Rôle et régulation de l'apeline au
cours du **vieillissement musculaire**

The exercise-apelin-myogenesis cycle reverses age-associated sarcopenia.

Vinel Claire, Lukjanenko Laura, BatutAurelie, Deleyruelle Simon, Pradère Jean-Philippe, Geoffre Nancy, Pereira Ophelie, Mouisel Etienne, Mouly Vincent, Vigneau Mathieu, Pillard Fabien, Cesari Matteo, Pahor Marco, Feige Jerome, Vellas Bruno, Valet Philippe & Dray Cedric

1. Institut du Metabolismeet des Maladies Cardiovasculaires (I2MC) de Toulouse Ranguel. 1 avenue Jean Poulhes CHU Ranguel 31432 Toulouse Cedex 4, France
2. Université de Toulouse-Université Paul Sabatier Toulouse III, France
3. Nestlé Institute of Health Sciences SA Campus EPFL, EPFL Innovation Park, Building H, 1015 Lausanne (Switzerland)
4. ITAV-USR3505 Centre Pierre Potier, 1 place Pierre Potier, Entrée B, BP 50624, 31106 Toulouse Cedex 1, France
5. Gérontopole Toulouse-Purpan, PavillonJunod ,170, avenue de Casselardit , TSA 40031 , 31059 Toulouse Cedex 9
6. Institute on Aging, College of Medicine, University of Florida, Gainesville, FL, USA
7. Institut de Myologie Université Pierre et Marie Curie, Paris 6UM76 - UPMC Univ. Paris 6/U974 - Inserm / UMR7215 – CNRS
G.H. Pitié-Salpêtrière -INSERM, UMRS 9748

A] Régulation de l'apeline dans la physiologie musculaire au cours du temps de la cellule à l'homme.

L'ensemble des travaux qui ont été développés dans l'introduction de ce manuscrit montre l'importance de la détection précoce des troubles musculaires liés à l'âge ainsi que le peu de solution permettant la prise en charge de la sarcopénie. En effet, l'absence de biomarqueurs caractéristiques du vieillissement musculaire ne permet pas un diagnostic précoce de la pathologie. Pourtant, ils sont indispensables pour émettre des recommandations comportementales telles que la pratique régulière d'exercice physique à intensité modérée ou un changement de comportement alimentaire. De plus, il a pu être démontré que la pratique régulière d'un exercice physique pouvait avoir des conséquences très différentes en termes de masse musculaire et de récupération de force chez la personne âgée en fonction du sujet. Il apparaît alors nécessaire de pouvoir détecter les individus à risque de développer de façon anormale une perte de leur masse musculaire (individus pré fragiles à fragiles) ainsi que d'évaluer le type d'exercice le plus adapté (durée, intensité,...) permettant une prévention optimale. Ainsi, nous avons émis l'hypothèse que les productions myocytaires pourraient être de bons candidats pour estimer l'état physiologique du muscle en situation basale et au cours d'un exercice physique. Compte tenu de l'expérience développée dans le laboratoire vis à vis de l'apeline, nous avons concentré nos investigations sur cette cytokine.

1/ Le système apeline/APJ est diminué au cours du vieillissement

Afin de déterminer l'importance du système apeline/APJ au cours du vieillissement musculaire, nous avons tout d'abord mesuré les niveaux plasmatiques d'apeline chez des souris âgées de 3, 12 et 24 mois. Les résultats de la **figure 1a** (partie gauche) montrent une diminution faible mais significative des taux plasmatiques du peptide avec l'âge. De plus, parallèlement à cette étude préclinique, nous avons eu accès à différentes cohortes humaines nous permettant de doser l'apeline plasmatique

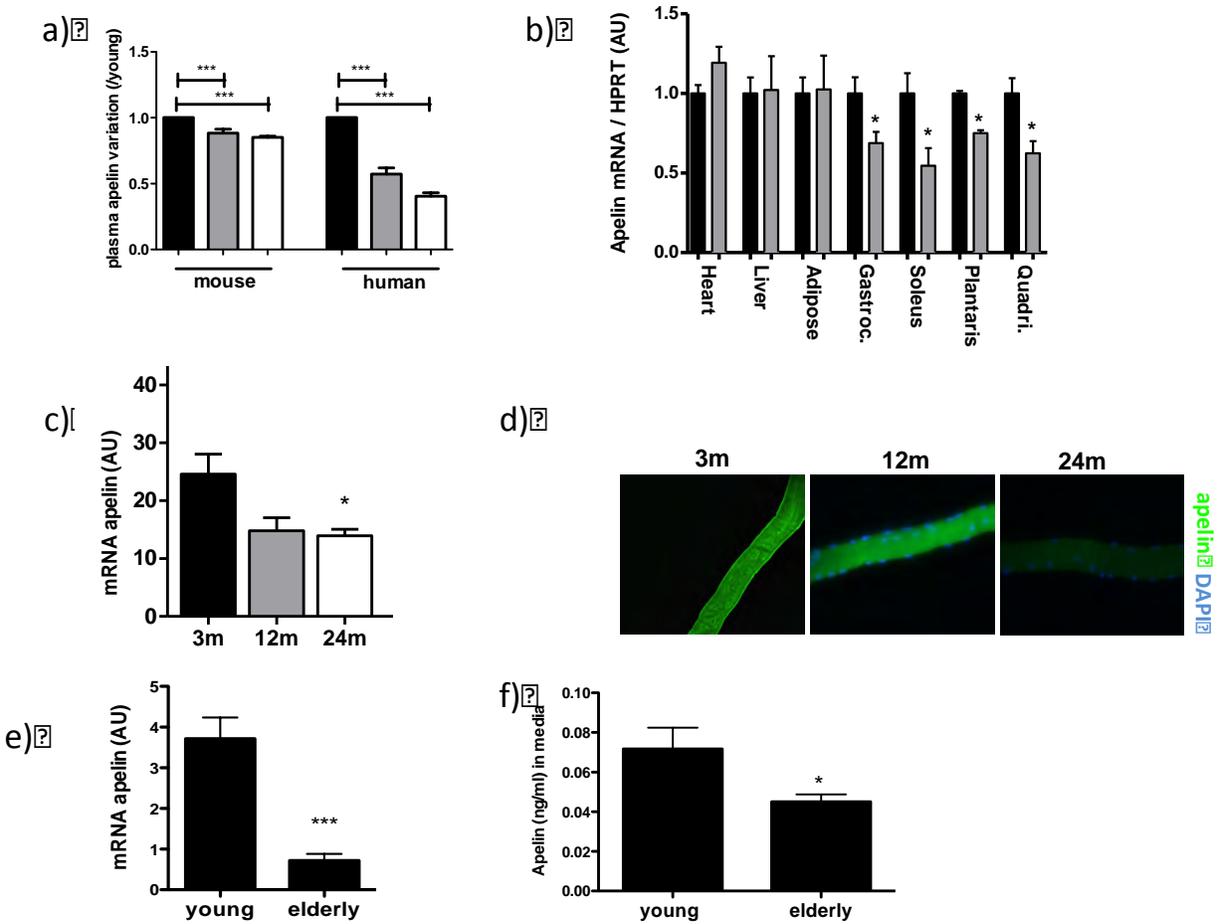


Figure 1 : Diminution de l'apeline plasmatique et musculaire au cours du vieillissement

a) Variations plasmatiques d'apeline chez des souris de 12 mois (barres grises, n=10) et 24 mois (barres noires ; n=10) par rapport à des souris de 3 mois (barre noire, n=10) et chez des individus âgés de plus de 70 sains (barre grise ; n=32) ou sarcopéniques (barre blanche ; n=31) comparée à des individus jeunes (28 +/-2.5 ans ; barre noire, n=16). **b)** Expression génique de l'apeline dans différents tissus de souris de 3 mois (barres noires, n=5) ou de 12 mois (barres grises ; n=6). **c)** Expression de l'ARNm de l'apeline dans des fibres musculaires isolées issues d'EDL de souris de 3, 12 et 24 mois; moyenne de 4 expériences différentes. **d)** Marquage immunohistochimique dirigé contre l'apeline (en vert) et DAPI (noyaux, en bleu) sur des fibres isolées de muscle squelettique (EDL) de souris de 3, 12 et 24 mois. **e)** Expression de l'ARNm et **f)** production basale dans le milieu de culture de l'apeline dans des cellules musculaires humaines en culture différenciées pendant 14 jours issues d'un donneur de 19 ans (young) ou de 79 ans (elderly); moyenne de 4 expériences différentes. *p<0.05 vs contrôle jeune, **p<0.01 vs contrôle jeune ; ***p<0.001

chez des individus jeunes (28 +/- 2,5ans) pratiquant une activité sportive modérée et chez deux groupes d'individus âgés de plus de 70 ans que nous avons pu caractériser en fonction de leur masse maigre appendiculaire (voir Matériel & Méthodes) comme présentant un vieillissement musculaire normal ou pathologique (sarcopéniques). Ainsi, la **figure 1a** (partie droite) montre qu'en comparaison des individus jeunes, les individus de plus de 70 ans présentent une diminution significative de leur apelinémie. Cette diminution est encore plus exacerbée chez les personnes âgées sarcopéniques (colonne blanche, **fig 1a**). Dans un souci d'identification des cibles tissulaires capables d'expliquer cette diminution des taux plasmatiques d'apeline, nous avons analysé l'expression de l'apeline (**fig 1b**) et de son récepteur (non montré) chez la souris âgée dans différents tissus. Comme le montre la **figure 1b**, la diminution d'expression génique de l'apeline est spécifique des tissus musculaires. Ce résultat est confirmé d'une part, par l'analyse de l'expression génique (**figure 1c**) et protéique par immunomarquage anti-apeline (**figure 1d**) de fibres isolées à partir de muscles squelettiques (EDL) de souris de 3, 12 et 24 mois. D'autre part, dans un modèle *in vitro* de cellules humaines musculaires immortalisées, l'expression génique (**figure 1E**) et la production (**figure 1f**) de l'apeline sont diminuées dans les cellules issues d'un individu de 79 ans par rapport à celles issues d'un individu plus jeune (19 ans).

Les résultats de la **figure 1** montrent que l'apeline est diminuée au cours du vieillissement et plusieurs éléments sont en faveur d'une spécificité musculaire autant chez la souris que chez l'homme. Par ailleurs, la mise en évidence d'une sécrétion de l'apeline par la cellule musculaire vient confirmer chez l'homme les travaux initiés par Bertrand et al. [264] montrant, grâce à un modèle murin *in vitro* (C2C12), que l'apeline pourrait être considérée comme une myokine. Par conséquent, nous avons porté notre intérêt à comprendre les régulations de l'apeline au niveau musculaire au cours du vieillissement.

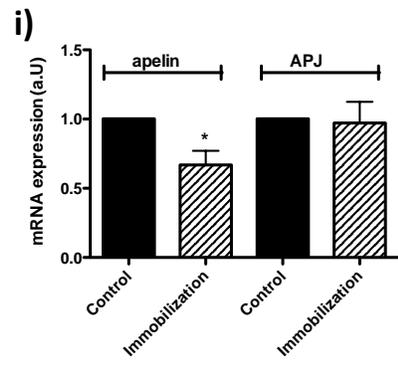
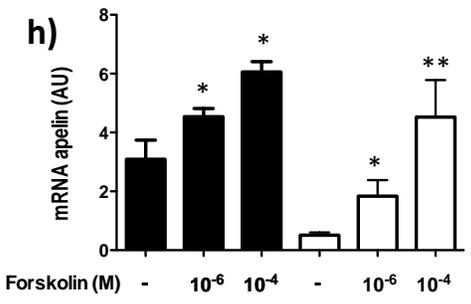
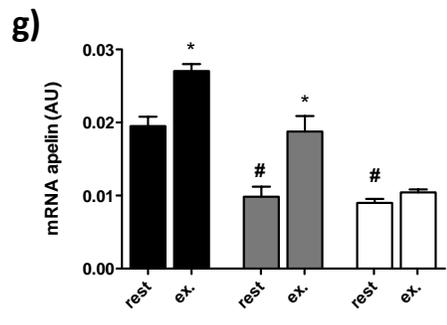
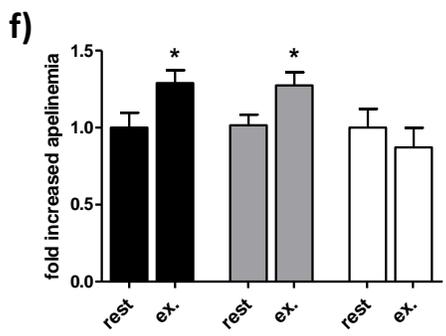
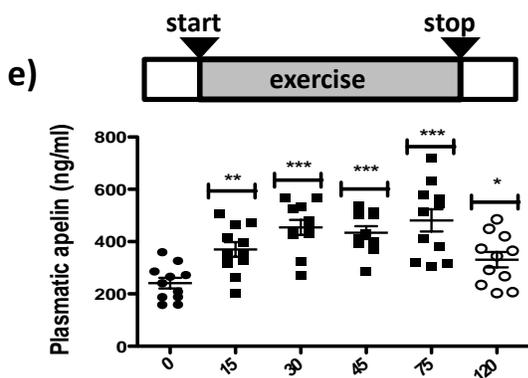
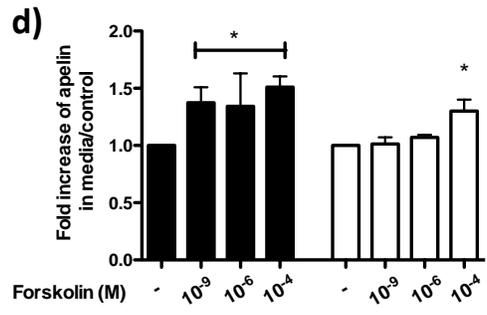
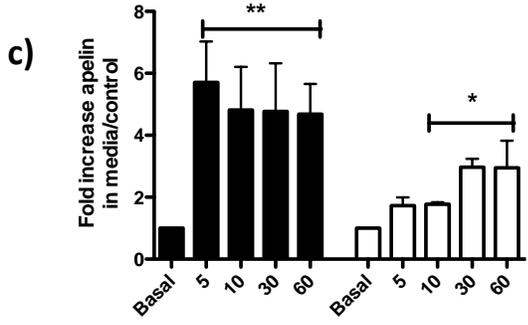
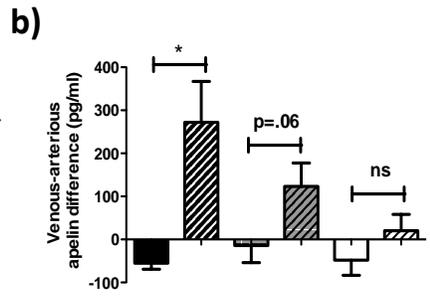
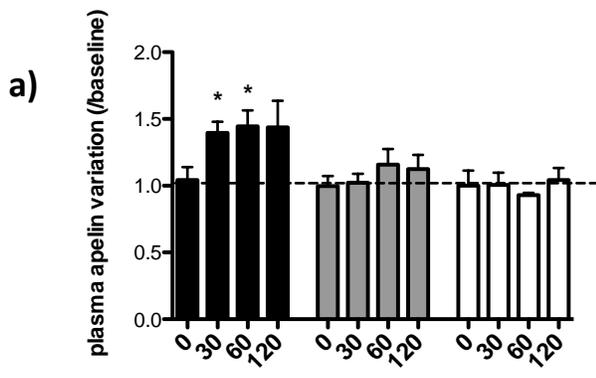


Figure 2 : Réduction des capacités de production de l'apeline par la cellule musculaire en réponse à une contraction au cours du vieillissement

a) Apelinémie mesurée au cours d'un exercice physique chez la souris de 3, 12 et 24 mois. Les animaux sont soumis à un exercice sur tapis roulant à 70 % de leur VO₂max pendant 60 minutes. Les prélèvements de sang sont effectués à la queue avant (T0), 30 minutes après (T30), à la fin (T60) et une heure après (T120) le début de l'exercice. n=4 souris par groupe ; *p<0.05 vs T0. **b)** Mesure différentielle de l'apeline plasmatique dans le sang issu de l'artère carotide et de la veine fémorale. L'apeline libérée par le muscle est calculée par la différence entre l'apeline veineuse et artérielle. Les mesures sont réalisées en condition de repos (barres pleines) et sous stimulation électrique du nerf sciatique entraînant la contraction musculaire (barres hachurées). n=8 souris par groupe ; *p<0.05 vs repos. **c et d)** Les taux d'apeline contenus dans le milieu de culture sont mesurés par ELISA pour les lignées de cellules humaines issues d'un patient jeune (young, barres noires) et âgé (elderly, barre blanche). Après rinçage des cellules, elles sont soumises à une stimulation électrique de différentes durées (5, 10, 30 et 60 minutes, 30 V, 0.1 mA) induisant leur contraction (**c**) ou à un traitement à la forskoline à différentes concentrations (10⁻⁹, 10⁻⁶ et 10⁻⁴M) pendant 30 minutes (**d**). **e)** Dosages plasmatiques de l'apeline au cours d'un exercice physique aigu réalisé sur un vélo ergométrique chez des individus jeunes (28±2.5 ans) entraînés (n=12). **f et g)** Apeline plasmatique (**f**) et expression génique musculaire (**g**) mesurées à la fin (« ex ») d'un protocole d'entraînement physique de 28 jours sur tapis roulant incliné (+10%) pendant 1h, 6j/7 chez des souris des 3, 12 et 24 mois et chez des souris n'ayant pas pratiqué d'exercice du même âge (« rest »). **h)** Expression génique de l'apeline dans les cellules humaines musculaires en culture issues d'un donneur jeune (colonne noires) ou d'un donneur âgé (colonnes blanches) traitées à la forskoline pendant 24 heures. Moyenne de 4 expériences différentes et indépendantes, *p<0.05 vs basale du même donneur, **p<0.01 vs basale du même donneur. **i)** Expression génique de l'apeline et d'APJ dans des muscle soleus de souris jeunes immobilisées pendant 15 jours, n=4 souris/groupe, *p<0.05 vs contrôle.

2/ La capacité de l'exercice à stimuler la production d'apeline musculaire est altérée avec l'âge.

Comme nous l'avons évoqué dans l'introduction de ce manuscrit, plusieurs articles ont déjà émis l'hypothèse d'une production d'apeline musculaire contrôlée par l'exercice. En effet, au cours des 5 dernières années, la synthèse et la sécrétion d'apeline dans le muscle a pu être démontrée au laboratoire [264] *via* un modèle de cellules musculaires murines en culture (C2C12) puis, le contrôle par l'exercice a été démontré au sein de cohortes d'individus obèses ou de sportifs de haut niveau [285] [308] et complétés par une étude chez le rat obèse [309]. Cependant, dans ces travaux, l'étude des variations d'apelinémie et d'expression du peptide dans le muscle sont rarement associées et l'effet d'un exercice chronique sur l'expression de l'apeline est d'abord observé comme la conséquence d'une perte de poids. De plus, aucune étude ne fait état de la relation entre exercice et apeline au cours du vieillissement.

Afin de mieux appréhender l'impact du vieillissement sur les variations des taux d'apeline plasmatique et musculaire au cours d'un exercice, nous avons tout d'abord mesuré l'apelinémie lors d'un effort physique aigu de 60 minutes sur tapis roulant chez des souris de 3, 12 et 24 mois. Les résultats de la **figure 2a** nous montrent que les taux d'apeline plasmatiques chez la souris jeune augmentent de 50% alors que les souris de 12 et 24 mois ne sont pas en capacité de faire augmenter leur apelinémie en réponse à un exercice physique malgré une intensité similaire (65% VO₂max). Ce résultat montre

qu'un défaut de production de l'apeline a lieu chez les souris âgées et nous a conduit à observer l'effet propre de la contraction musculaire sur la production d'apeline par ce tissu (**Figure 2b**). Pour cela, nous avons analysé les variations artério-veineuses d'apeline au niveau des muscles de la patte chez la souris anesthésiée. Afin de mimer une contraction musculaire, nous avons stimulé le nerf sciatique par une impulsion électrique. La connexion des muscles plantaris et tibialis avec un capteur de force nous a permis de mesurer la force maximale développée en réponse à la stimulation (détaillé dans le Matériel & Méthodes). Le résultat de la **figure 2b** met en évidence la perte de la capacité des muscles de souris âgées à sécréter de l'apeline avec l'âge lors de la contraction (colonnes hachurées). De plus cette figure permet également de mettre en avant la spécificité de l'origine musculaire de la production d'apeline au cours de l'exercice. Afin de confirmer cet effet dans un modèle humain, nous avons provoqué des contractions sur des cellules humaines musculaires *in vitro* par impulsion électrique ou par un traitement à la forskoline capable d'augmenter les taux intracellulaire d'AMPc et ainsi de mimer une contraction musculaire. Comme le montrent les **figures 2c** et **d**, une contraction musculaire (**2c**) dans un modèle de cellule humaine ou une augmentation artificielle de la concentration en AMPc mimant la contraction (**2d**) provoquent tous deux une augmentation de la production d'apeline par des cellules musculaires humaines quel que soit l'âge du donneur. Cependant, nous pouvons remarquer qu'au cours des deux protocoles, les cellules musculaires d'individu âgé possèdent une capacité à produire de l'apeline altérée par rapport aux cellules d'un donneur jeune. Ainsi, nous pouvons supposer qu'un effet seuil existe quant à la stimulation de la synthèse d'apeline par l'exercice physique et qu'une augmentation de l'intensité de l'exercice imposé aux souris aurait pu engendrer une régulation positive de la production du peptide. Enfin, en attendant de pouvoir doser l'apelinémie au cours d'un exercice aigu chez l'homme âgé, nous avons mesuré les variations du peptide dans le sang d'individus jeunes au cours d'un exercice (70% VO₂max) pratiqué sur un vélo ergométrique. Les résultats confirment ce que nous avons pu observer chez la souris puisque la **figure 2e** montre une augmentation rapide et durable de l'apelinémie chez ces individus.

L'effet chronique d'un exercice physique a également été observé sur la production d'apeline (**2f, g, h** et **i**). En effet, nous avons imposé à des souris âgées de 3, 12 et 24 mois une activité physique quotidienne (30 min de course à 65% de leur VO₂max) pendant 28 jours. Comme le montre la **figure 2g**, cet exercice a provoqué une

augmentation de l'expression du transcrit de l'apeline musculaire chez des souris de 3 et 12 mois seulement. Cette régulation est retrouvée dans le plasma comme le montre dans la figure **2f**. De plus, un traitement de 24 heures à la forskoline de cellules musculaires humaines permet la même augmentation de l'expression de l'apeline quelque soit l'âge du donneur dont sont issues les cellules (**2h**). Cependant, là aussi, nous pouvons remarquer qu'il faut des concentrations de forskoline plus importantes pour atteindre, chez les cellules issues d'un donneur âgé, la même production d'ARNm que celle observée chez les cellules issues d'un donneur jeune (**figure 2h**). Enfin, afin d'étudier les effets d'un processus opposé à l'exercice sur la production d'apeline et d'APJ, nous avons réalisé, en collaboration avec le Pr A. Chopard à Montpellier, une immobilisation (15 jours) musculaire chez la souris et mesuré l'expression génique de l'apeline (**figure 2i**). Ces expériences montrent que la synthèse du transcrit de l'apeline est significativement diminuée au cours de l'immobilisation ayant entraîné une atrophie musculaire. Ainsi, l'ensemble de ces résultats montre que l'apeline est produite en réponse à une contraction musculaire ce qui, à l'échelle de l'organisme se traduit par une augmentation de l'apeline plasmatique. Cependant, il apparaît qu'en cas d'atrophie musculaire, comme observé chez la souris âgée ou chez la souris immobilisée, les taux d'apeline musculaire diminuent et semblent être nettement moins sensibles à l'exercice.

B] Rôle de l'apeline dans le vieillissement musculaire

Compte tenu des altérations de production de l'apeline par le muscle au cours du vieillissement, nous avons émis l'hypothèse d'un lien entre les régulations du peptide et les dysfonctions musculaires associées au vieillissement. Pour cela, nous avons dans un premier temps comparé des souris âgées de 12 mois déficientes pour l'apeline (knock-out, *apeline^{-/-}*) ou pour son récepteur (knock-out, *APJ^{+/-}*) à des souris sauvages (WT) du même âge (**figure 3**). Puis, à l'inverse, nous avons supplémenté les souris âgées avec le peptide pour observer l'impact sur le muscle squelettique (**figure 4**).

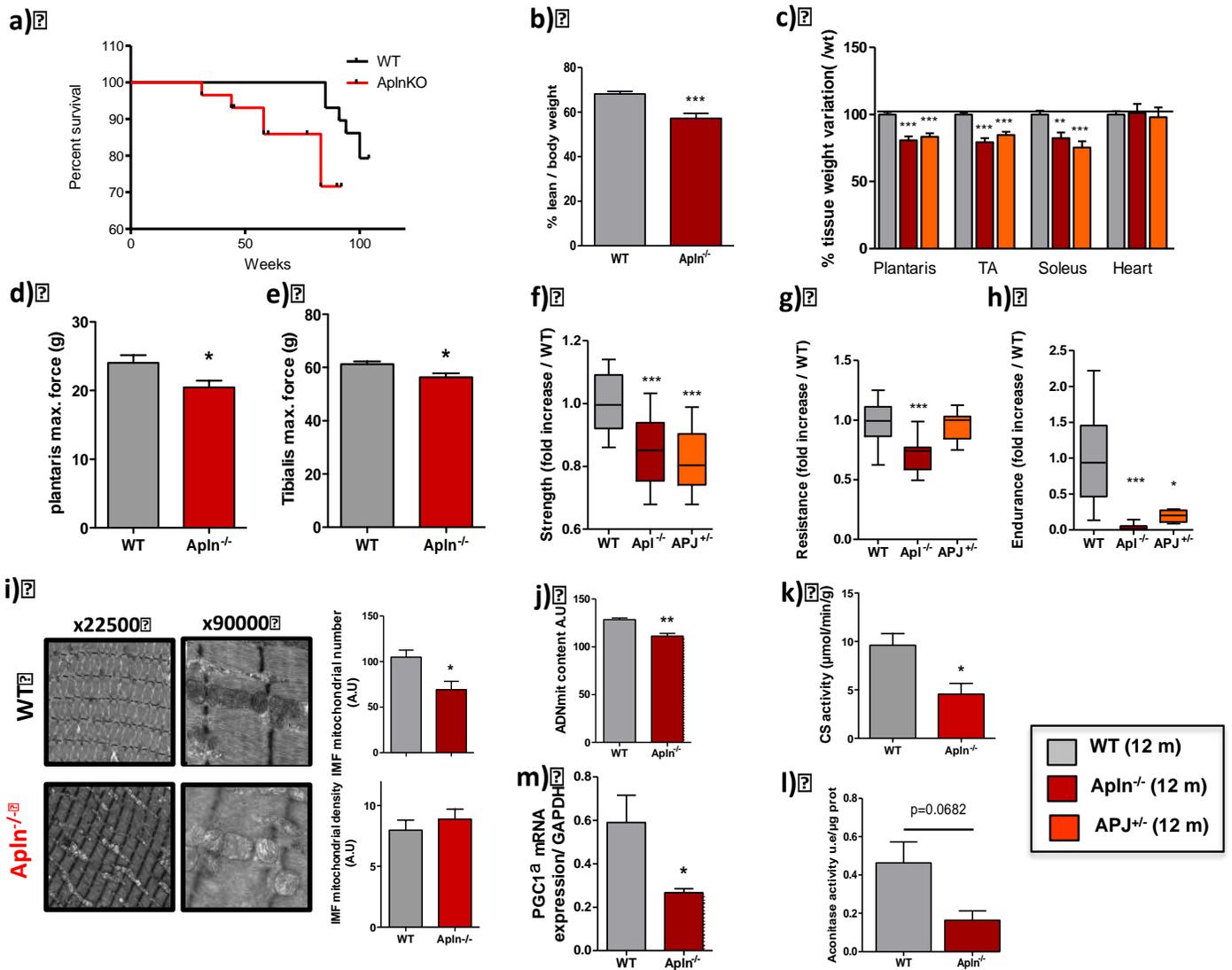


Figure 3: La déficience en apeline ou APJ entraîne des altérations musculaires prématurément au cours du temps

a) Courbe de longévité de souris WT (noire) et $Apln^{-/-}$ (rouge) exprimée en pourcentage de souris en vie en fonction de leur âge en semaines. **b)** Masse maigre totale mesurée par echoMRI, exprimée en pourcentage du poids du corps des souris. **c)** Masse de tissus musculaire squelettique (plantaris, tibialis antérieur et soleus) et cardiaque exprimée en pourcentage du poids du corps des souris. **d et e)** Force maximale de contraction développée par le muscle *plantaris* (d) et *tibialis* antérieur (e) en réponse à la stimulation électrique du nerf sciatique des souris. **f g et h)** Performances physiques *in vivo* des souris de 12 mois WT, apeline $^{-/-}$ et APJ $^{+/-}$. La force musculaire des souris est mesurée par *grip test* et exprimée en fonction du poids corporel (N/g) (f). La résistance des souris est mesurée par le temps qu'elles sont capables de rester accrochées sous une grille suspendue (g). L'endurance est évaluée par la vitesse maximale (cm/sec) que les souris sont capables d'atteindre sur tapis roulant (h). **i)** Illustration de mitochondries IMF de muscles squelettiques (soleus) de souris WT et déficientes en apeline à 2 grossissements. Images obtenues à l'aide du microscope électronique à transmission HITACHI HU 12A et quantification de la quantité de mitochondries IMF à l'aide du logiciel ImageJ. **j)** Contenu en ADN mitochondrial de muscle squelettique de souris (soleus). **k)** Activité enzymatique de la citrate synthase (k) et aconitase (l) sur mitochondries isolées de muscles squelettique de souris. **m)** Expression génique de PGC-1 α dans le muscle plantaris.

1/ Conséquences d'un manque d'apeline et de son récepteur APJ sur le vieillissement musculaire.

Dans la **figure 3a**, nous pouvons voir que les souris déficientes en apeline ont une durée de vie plus courte que les souris WT comme le montre la courbe de longévité. Sans préjuger des causes entraînant la létalité de ces animaux, cette observation suggère que l'apeline est nécessaire au vieillissement normal des souris. Cependant, cette durée de vie raccourcie nous a conduit à ne travailler que sur des souris déficientes âgées de 12 mois. Leur caractérisation musculaire montre qu'elles présentent une masse maigre totale (mesurée par echoMRI) inférieure à celle des souris sauvages (**figure 3b**). La pesée de l'ensemble des tissus de ces souris montre que seuls les muscles squelettiques présentent une masse inférieure à celle des souris contrôle. En effet, la masse du plantaris, du tibialis antérieur et du soleus (muscles des membres inférieurs) est plus faible chez les souris déficientes en apeline alors que la masse du muscle cardiaque ne semble pas affectée ni par le manque d'apeline, ni par celui d'APJ (**3c**). Ces résultats suggèrent que la déficience en apeline ou APJ touche la masse maigre et plus particulièrement celle les muscles striés squelettiques. Dans un second temps, l'exploration fonctionnelle de ces animaux a montré une altération des performances musculaires globales des animaux. En effet, la **figure 3 (f g et h)** montre que la force musculaire (mesurée par grip test), l'endurance (sur tapis roulant) et la résistance (par le test de la grille retournée) sont altérées chez les animaux déficients pour l'apeline ou pour son récepteur (APJ^{-/-}). Afin d'étudier la fonction musculaire de façon plus précise en isolant le muscle squelettique, nous avons induit la contraction des muscles des membres inférieurs *in vivo* sous anesthésie générale, par stimulation électrique du nerf sciatique chez les souris *apln^{-/-}*. Les deux muscles étudiés (plantaris et tibialis antérieur) présentent une force musculaire altérée par rapport aux souris sauvages. Par conséquent, le phénotypage de ces animaux nous a permis de mettre en évidence des altérations musculaires chez les animaux âgés déficients en apeline ou en APJ tant sur la masse que sur la fonction.

Compte tenu de ces effets, nous avons étudié l'impact du manque d'apeline sur les mitochondries afin de mettre en évidence des mécanismes moléculaires potentiels. Les résultats obtenus précédemment obtenus par le laboratoire ont montré que le couple apeline/APJ pouvait avoir une action sur ces organites et sur le métabolisme

musculaire en générale [270] [271]. Les observations des muscles par microscopie électronique (ME) montrent, au niveau des mitochondries intramyofibrillaires (IMF), une matrice moins dense, qui apparaît plus claire, chez les muscles de souris knock-out par rapport aux souris sauvages, suggérant une altération de la fonction (**figure 3i**). Ces altérations sont associées à une diminution du nombre de mitochondries IMF chez les souris déficientes comme le montre la quantification de la **figure 3i** (figure du haut). Comme cité dans l'introduction de ce manuscrit, mesurer le contenu en mitochondrie apparaît délicat du fait de leur morphologie dynamique (fission/fusion). Dès lors, la diminution du nombre de mitochondries que nous observons chez nos souris peut être le résultat d'une diminution du contenu en mitochondries ou un déséquilibre du ratio fission/fusion en faveur de la fusion. Or, la quantification de la densité mitochondriale n'a pas révélé de différence entre les deux types de souris (WT et $apln^{-/-}$) suggérant un phénomène de fusion prédominant générant des mitochondries de plus grande taille. Cependant, les muscles des souris déficientes présentent un ratio ADN mitochondrial/ADN nucléaire (**Fig 3j**), une activité citrate synthase (**Fig 3k**) et l'expression de PGC-1 α (**Fig 3m**) diminués chez les souris knock-out, suggérant un contenu en mitochondrie et une mitochondriogénèse altérée. De plus, afin d'étudier les conséquences de ces altérations mitochondriales, nous nous sommes intéressés à l'activité aconitase comme témoin du stress oxydatif (**Figure 3l**). En effet, du fait de son noyau fer-souffre, cette enzyme est particulièrement sensible à l'oxydation par la présence d'ERO. Or, celle-ci apparaît diminuée chez les souris déficientes, ce qui va dans le sens d'un stress oxydatif augmenté au niveau musculaire de ces souris. Ces derniers résultats appuient une altération du contenu mitochondrial, en désaccord avec les quantifications des images obtenues par ME. Deux possibilités peuvent expliquer ces différences. D'abord, la quantification du contenu en mitochondries à partir d'images de ME peut être limitée par l'axe de la coupe du tissu et l'observation en deux dimensions entraînant un biais dans les mesures. D'autre part, nous avons seulement observé en ME les mitochondries IMF. Sachant que les mitochondries subsarcolemmales sont connues pour être plus sensibles au vieillissement, elles gagneraient à être plus observées dans le cadre de cette étude.

Au cours de notre étude sur la longévité des souris déficientes en apeline (**3a**), nous avons suivis tous les mois les souris déficientes en apeline sur des paramètres comme

leur poids, la composition corporelle par echoMRI ainsi que le profil métabolique par la sensibilité à l'insuline et la tolérance au glucose. Les résultats ne sont pas montrés dans ce manuscrit, cependant, il s'avère que jusqu'à 3 mois, les souris sauvages et déficientes en apeline apparaissent similaires suggérant que la déficience en apeline n'altère pas le développement et la croissance de ces animaux. A partir de 3 mois, par contre, des différences apparaissent, les souris $apln^{-/-}$ prennent du poids plus rapidement et montrent une diminution progressive de la masse maigre et de la tolérance au glucose associée à une diminution des performances musculaires. Cela montre que les altérations de masse et de fonction musculaire que l'on observe dans la **figure 3** sont apparues progressivement et suggèrent un lien important entre rôle métabolique de l'apeline et vieillissement musculaire prématuré.

2/ Impact d'une supplémentation en apeline sur le vieillissement musculaire.

Les souris sauvages de 3, 12 et 24 mois ont été traitées par voie intra-péritonéale quotidiennement pendant 28 jours à la (Pyr)-apeline-13 (Bachem) à la dose de 0,5 $\mu\text{mol/kg/jour}$. Tout d'abord, cette dose ne correspond pas à celle habituellement (0,1 $\mu\text{mol/kg/j}$) utilisée pour les traitements chroniques de souris obèses pratiqués par notre laboratoire et celui de l'équipe d'Yoshimatsu [271] [310]. En effet, après avoir testé différentes doses et différentes administrations (0.1 ou 0.5 $\mu\text{mol/kg/j}$ injectée 1 ou 2 fois par jours pendant 28 jours), les effets le plus significatifs et présentés dans ce manuscrit ont été obtenus avec une injection par jour à la dose de 0,5 $\mu\text{mol/kg/j}$ (**figure 4a**).

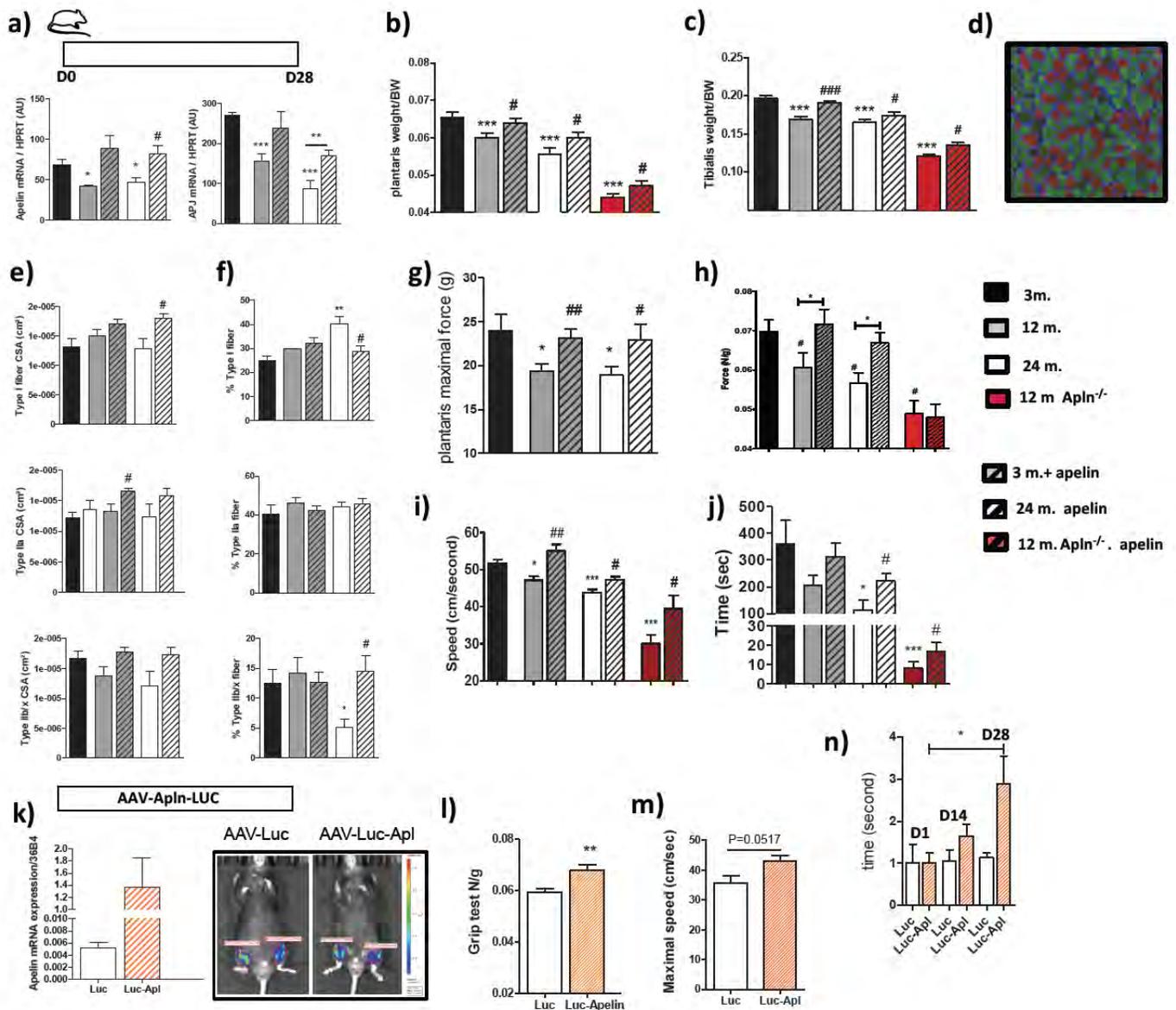


Figure 4 : La supplémentation en apeline reverse les altérations musculaires liées au vieillissement.

a) Expression génique de l'apeline et d'APJ dans les muscles de souris de 3, 12 et 24 mois traitées (barres achurées) ou pas (barres pleines) par de l'apeline (0,5 μ mol/kg/j) **b et c)** Poids des muscles plantaris (**b**) et tibialis antérieur (**c**) rapporté au poids corporel des animaux à l'issue du traitement **d)** et **e)** Image d'illustration d'immunohistochimie des 3 types de myosines (Type IIa en vert, type I en rouge et type IIb/x non marquées, laminine en bleu). **e)** Typologie musculaire, répartition en pourcentage des 3 types de fibres après le traitement à l'apeline. **f)** Répartition des fibres par taille, indifféremment de leur type. **g)** Force maximale de contraction développée par le muscle plantaris en réponse à la stimulation électrique du nerf sciatique des souris. **h)** La force musculaire des souris est mesurée par *grip test* et exprimée en fonction du poids corporel (N/g) L'endurance est évaluée par la vitesse maximale (cm/sec) que les souris sont capables d'atteindre sur tapis roulant (**i**). La résistance des souris est mesurée par le temps qu'elles sont capables de rester accrochées sous une grille suspendue (**j**). **k)** Illustration de l'activité luciférase de l'AAV (contrôle luciférase seule ou couplée à l'apeline) 1 semaine après injection intra musculaire dans le tibialis antérieur et le gastrocnémien de l'AAV et expression génique de l'apeline (gauche) dans le gastrocnémien 5 semaines après l'injection. **l), m)** et **n)** Performances physiques *in vivo* des souris injectées avec l'AAV-luc ou couplé à l'apeline.

Au cours de ce protocole, les souris ont été suivies chaque semaine en termes de poids, de composition corporelle (par echoMRI), de performances physiques et de métabolisme (tolérance au glucose et sensibilité à l'insuline). La **figure 4a** confirme la baisse de l'expression d'apeline avec le vieillissement et révèle celle de son récepteur APJ (**figure 4a**, droite). Cependant, de façon très intéressante, le traitement à l'apeline permet une augmentation des ARNm du peptide et de son récepteur dans le muscle. Bien que cela soit inattendu, cette régulation du récepteur par le ligand a déjà été mise en évidence plusieurs fois pour le couple apeline/APJ.

Lors de ce protocole, nous avons pu confirmer que la masse des muscles squelettiques était diminuée avec l'âge. De façon très intéressante, le traitement à l'apeline permet d'augmenter la masse des muscles (plantaris et tibialis antérieur) des souris âgées quel que soit leur âge (**figure 4b**). Plus précisément, le marquage des différents types de myosines sur des coupes transversales des muscles nous a permis d'étudier la répartition (**4f**) des fibres de chaque type (I, IIa et IIb/x) ainsi que la surface de chacun (**4e**). Ainsi, l'augmentation de la masse musculaire des souris âgées traitées se caractérise par une augmentation de la surface des fibres I, IIa et IIb/x, montrant que l'apeline génère une hypertrophie des fibres musculaires indépendamment de leur métabolisme (oxydatif ou glycolytique) (**3e**). Au cours du vieillissement, un changement des fibres vers un phénotype oxydatif est observé chez les rongeurs et les hommes en raison de la plus grande susceptibilité à l'apoptose des fibres glycolitiques de type IIb/x comme mentionné dans l'introduction de ce manuscrit. Comme le montre la **figure 4f**, nous retrouvons ces observations et, de façon intéressante, le traitement à l'apeline reverse ce phénomène en rééquilibrant la répartition des fibres selon un profil comparable aux muscles de souris plus jeunes (**figure 4f**). Au niveau fonctionnel, cela se traduit par une amélioration de la force de contraction à l'échelle d'un muscle squelettique (**4g**) induite par stimulation du nerf sciatique. Lors d'une approche plus globale, les performances musculaires mesurées par la force (**4h**), l'endurance (**4i**) et la résistance (**4j**) des souris, altérées par le vieillissement, sont améliorées par le traitement à l'apeline chez les souris âgées mais également chez les souris déficientes en apeline. Pour aller plus loin dans la démonstration, nous avons refait ces expériences avec une autre approche de supplémentation génétique *via* l'injection d'un AAV permettant la surexpression de l'apeline dans le muscle. Nous avons injecté les muscles gastrocnémiens et *tibialis* antérieur d'une patte des souris de 24 mois avec le

vecteur tandis que la patte contro-latérale est injectée avec le vecteur contrôle (ne contenant pas l'apeline). L'intégration des vecteurs dans les cellules et leur production sont contrôlées par bioluminescence grâce à l'activité de la luciférase qui a été accolée à l'expression de l'apeline ou insérée seule dans le vecteur (contrôle) (**figure 4k**). Après avoir observé par bioluminescence l'expression maximale de l'apeline dans les muscles (7 jours après injection, **fig 4k**), les différents paramètres sont évalués pendant 28 jours (**figure 4 l, m et n**). Par cette approche, nous avons retrouvé les mêmes effets bénéfiques de l'apeline sur le muscle squelettique, c'est ainsi que la **figure 4 (l, m et n)** montre une amélioration de la force, de la résistance et de l'endurance. Nous avons également pu vérifier (**figure 4k, gauche**) qu'après euthanasie des souris, les muscles injectés surexprimaient bien le transcrit de l'apeline.

La supplémentation en apeline les souris déficientes entraîne, au même titre que chez les souris âgées, une augmentation de la masse musculaire (**figure 4b et c**) ainsi que de la fonction musculaire (**4 h, i et j**). Nous remarquons cependant que parmi les tests fonctionnels, la force musculaire mesurée par grip test, n'est pas améliorée par le traitement chez les souris knock-out. Peut-être qu'avec un modèle déficient spécifique du muscle squelettique (inexistant à ce jour), nous aurions obtenu des résultats plus précis. Il est probable que la déficience globale en apeline doit entraîner de nombreuses modifications au niveau des tissus autres que musculaires sur lesquels nous n'avons pas de contrôle.

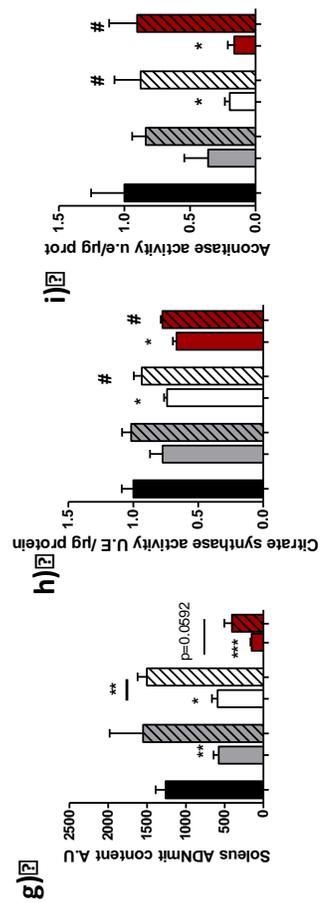
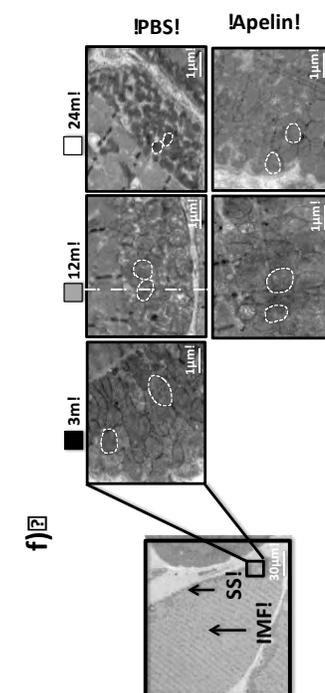
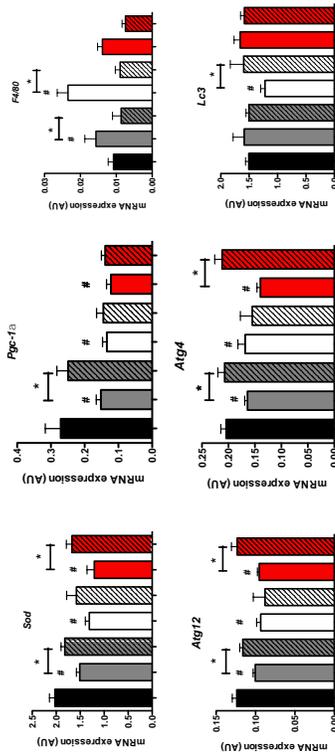
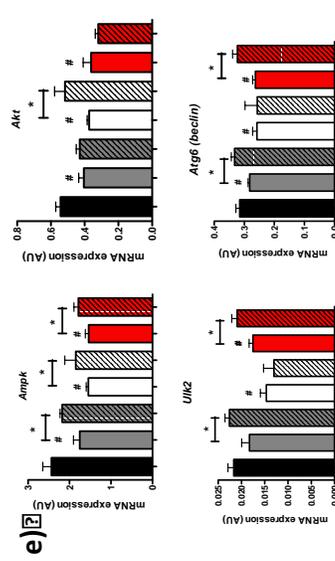
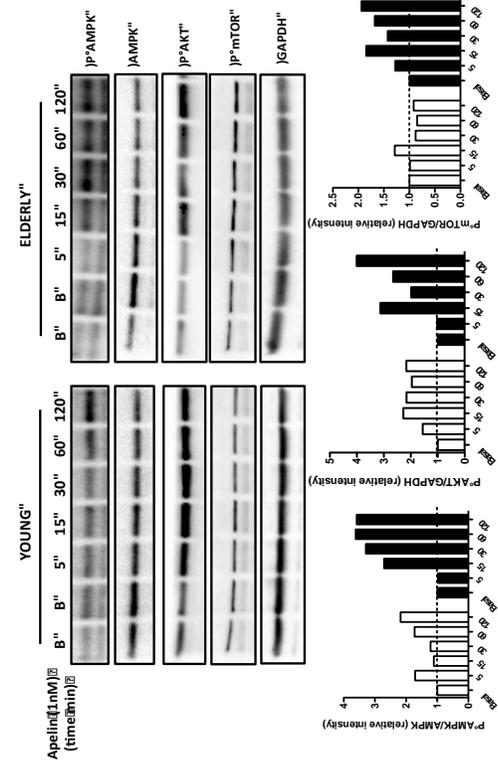
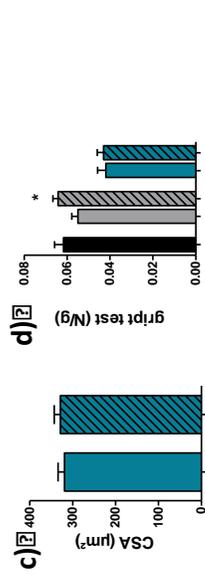
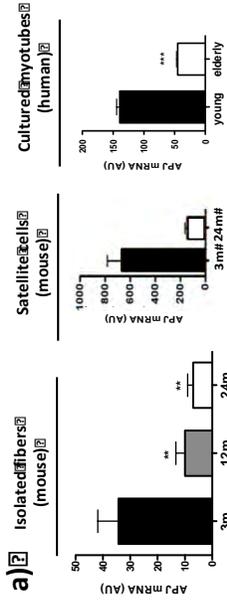


Figure 5 : Mécanismes moléculaires sous jacents aux effets de l'apeline sur le vieillissement musculaire.

a) Expression de l'ARNm d'APJ au niveau de fibres musculaires isolées d'EDL, de cellules satellites isolées par tri cellulaire ou de myotubes humains en culture, **b)** Western blot d'une cinétique de traitement à l'apeline (1nM) de cellules humaines issues de donneur jeunes (Young) et âgé (Elderly) traitées à l'apeline (1nM). Détection des protéines P^o-AMPK Thr 172, AMPK total, P^o Akt Ser 308, P^omTOR et GAPDH. Les graphes représentent la quantification des images des blots. **c)** Surface de section des fibres musculaire des souris AMPK-DN traitées (hachuré) ou pas (plein) à l'apeline **d)** Grip test en N/g des souris AMPK-DN (en bleu) traitées (hachuré) ou pas (plein) à l'apeline pendant 28 jours. Les données des souris de 3 mois (colonne noire) et de 12 mois (colonnes grises) sont données à titre indicatif. **e)** Données de Fluidigm Biomark d'expression d'ARNm de gènes codant pour Ampk, Akt, Sod, Pgc1- α , F4/80, Ulk2, Atg6, Atg12, Atg4 et LC3. **f)** Microphotographie en microscopie électronique de mitochondries subsarcolemales d'un muscle soleus à 3, 12 et 24 mois avec ou sans traitement de 28 à l'apeline. Les mitochondries sont entourées en blanc afin de mieux apprécier leur taille et leur forme. **g)** Contenu en ADN mitochondrial de muscle squelettique de souris (soleus). **h** et **i)** Activité enzymatique de la citrate synthase (**h**) et aconitase (**i**) sur mitochondries isolées de muscles squelettique de souris.

3/ Mécanismes moléculaires impliqués dans l'effet bénéfique de l'apeline au cours du vieillissement

Afin de mieux appréhender les effets de l'apeline sur le muscle de la personne âgée, nous avons entrepris de déterminer par quels mécanismes moléculaires le peptide pouvait agir. Ainsi, nous avons tout d'abord pu montrer que le récepteur APJ était présent alternativement sur les deux principales cellules du muscle de la souris : le myocyte et la cellule satellite (**figure 5a et b**). Bien que l'expression du récepteur soit diminuée avec l'âge dans les deux types de cellule, les effets observés *in vivo* chez ces animaux nous ont conduit à étudier les voies de signalisation sous-jacentes permettant d'expliquer le rôle biologique de l'apeline.

L'étude des effets à court terme de l'apeline nous a tout d'abord permis de mettre en évidence que sur des cellules humaines issues d'un donneur jeune et traitées à l'apeline (10^{-9} M), le peptide permettait une augmentation rapide (dès la 5^{ème} minute) de la phosphorylation de l'AMPK et d'AKT (**figure 5c**). Ce résultat confirme certains travaux de notre équipe où il avait été montré que l'apeline, *via* la phosphorylation activatrice de l'AMPK et d'AKT dans le muscle strié squelettique, permettait d'induire un transport de glucose [270]. De façon surprenante, la **figure 4d** montre que, malgré le vieillissement des cellules, l'apeline (10^{-9} M) possède toujours le même effet sur l'AMPK et sur AKT et active également la voie mTOR, impliquée dans la balance protéique. Ces résultats, qui mettent en évidence l'action à court terme de l'apeline, sont à compléter avec l'étude d'autres protéines (P70S6K, GSK3, ...) et l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques puis à

confirmer *in vivo* chez la souris. Cependant, l'activation de mTOR uniquement dans les cellules musculaires du donneur âgé souligne que l'apeline ne possède pas un effet anabolique mais permet plutôt de normaliser une situation pathologique. Cette spécificité d'action rend l'utilisation thérapeutique potentielle du peptide plus envisageable.

Afin de confirmer l'importance de l'AMPK dans la voie de signalisation de l'apeline dans un système intégré, nous avons réalisé des traitements *in vivo* chez des souris dépourvues d'activité AMPK dans le muscle squelettique (AMPK-DN) (**figure 5e et f**). Ainsi, sans activité de l'AMPK, le traitement à l'apeline ne permet plus d'augmenter la surface des fibres musculaires (**5e**) et la force de la souris âgée (**5f**) mettant en évidence le rôle indispensable de l'AMPK dans les effets trophiques de l'apeline sur le myotube au cours du vieillissement. En aval, l'action de l'AMPK est pléiotropique au sein de la cellule musculaire et son altération au cours du vieillissement est bien documentée ce qui rend la recherche de cibles spécifiques plus difficile. Ainsi, pour mieux comprendre par quels processus une exposition chronique à l'apeline permettait d'améliorer les paramètres physiologiques musculaires associés au vieillissement, nous avons mesuré les conséquences d'un traitement à l'apeline de 28 jours sur 96 gènes (Fluidigm® Biomark) chez les souris. Parmi ces gènes, nous pouvons tout d'abord voir de façon intéressante que le traitement à l'apeline est capable d'augmenter la transcription de l'AMPK et d'AKT dont l'expression est altérée au cours du vieillissement musculaire (**figure 5g**). En aval de l'AMPK, le traitement l'apeline permet de normaliser l'expression de gènes impliqués dans la biogénèse et le fonctionnement mitochondrial comme PGC1- α et la SOD essentiellement chez les souris de 12 mois (**figure 5g**). L'action de l'apeline sur la mitochondrie est confirmée par l'analyse en microscopie électronique de coupes de muscle de souris âgées traitées par le peptide. En effet, sur les microphotographies de la **figure 5h**, nous pouvons voir que l'apeline permet d'augmenter le nombre et la taille des mitochondries intramyofibrillaires des muscles des souris âgées. Ces résultats sont confirmés par l'augmentation de l'ADN mitochondrial observé chez les animaux de 12 et 24 mois traités par l'apeline. Enfin, une exposition de 28 jours à l'apeline permet aux muscles des souris âgées de présenter un fonctionnement mitochondrial amélioré comme démontré par l'analyse des activités de l'aconitase ou de la citrate synthase (**figure 5h et i**). L'implémentation de la biogénèse et de la fonction mitochondriale s'accompagne d'une augmentation de

l'expression de certains marqueurs métaboliques comme le transporteur de glucose GLUT4 ou l'enzyme responsable de la synthèse du collagène dans le muscle (GS) (non montré). Parallèlement à ces voies métaboliques, des travaux sont en cours afin de confirmer les effets de l'apeline sur des processus comme l'autophagie et l'inflammation qui sont impliqués dans les phénomènes de vieillissement musculaire et qui, lors de l'analyse Fluidigm[®] que nous avons réalisée, présentent une sensibilité à l'apeline. En effet, comme le montre la **figure 4g**, l'apeline permet d'augmenter l'expression de gènes impliqués dans l'autophagie (Atg4, Atg6, Atg12, Ulk2 ou LC3) ou de diminuer des marqueurs de l'inflammation (F4/80). Il reste donc à déterminer si ces processus sont des causes ou des conséquences de l'amélioration métabolique dépendante de l'AMPK/AKT et du meilleur fonctionnement mitochondrial. Sur les myotubes humains différenciés en culture, des traitements chroniques par l'apeline sont en cours. Les premiers résultats montrent une augmentation significative de l'expression de l'AMPK et d'ACC ainsi que de certaines myosines impliquées dans les processus de différenciation (non montré).

Les résultats sur le potentiel effet pro différenciant de l'apeline obtenus *in vitro* ainsi que la présence d'APJ sur les cellules satellites nous ont conduit à envisager un rôle de l'apeline sur la différenciation de ces cellules. Afin de répondre à cette question, une collaboration avec le laboratoire de Jérôme Feige à Lausanne nous a permis d'évaluer les effets de l'apeline sur les processus de régénération musculaire.

C] Rôle et régulation de l'apeline dans la régénération musculaire au cours du vieillissement.

Le muscle squelettique est un tissu capable de régénération grâce aux cellules satellites comme expliqué dans l'introduction de ce manuscrit. Au cours du vieillissement, ce mécanisme est altéré. Cependant, l'implication de ces cellules souches et de leur environnement est discutée dans un contexte de sarcopénie puisque certains auteurs affirment que le muscle du sujet âgé ne nécessite pas de régénération s'il n'est pas dégradé par des stress comme l'exercice physique par exemple. Néanmoins, les résultats précédemment décrits nous ont poussé à nous interroger sur le rôle et la régulation de l'apeline au cours de la différenciation cellulaire, qui, chez le sujet adulte est induit par un besoin de reconstruction suite à une lésion (un exercice physique, une fracture, ...). C'est ainsi que nous avons étudié l'effet de l'apeline sur la régénération musculaire induite par injection de cardiotoxine (CTX). Cette toxine a la particularité de dépolariser la membrane plasmique des cellules musculaires différenciées, alors que son injection laisse intacte les cellules satellites, qui sont activées et entrent dans les phases de différenciation en myoblastes et fusionnent pour former des cellules multinucléées, les myotubes et les nouvelles myofibres. Nous avons injecté dans le muscle tibialis antérieur de la CTX chez des souris âgées de 3, 12 et 24 mois. Dans chaque groupe d'âge, la moitié des souris ont été traitées au PBS et l'autre à l'apeline au moment de l'injection de CTX puis chaque jour suivant. Enfin, la cinétique de reconstruction a été étudiée après 3, 7 et 14 jours après l'injection par l'euthanasie de différents groupes d'animaux. L'analyse des muscles nous a permis d'apprécier la cinétique de régénération des souris et l'effet du traitement à l'apeline. Tous les paramètres considérés ne sont pas rapportés dans ce manuscrit. Seuls les souris de 3 et 24 mois sont représentés notamment. Dans un premier temps, il était intéressant de connaître l'évolution de l'expression de l'apeline et de son récepteur au cours de la régénération musculaire. Ainsi, la **figure 6a** montre que l'expression de l'apeline est fortement induite dans les phases précoces (3 jours), puis qu'elle diminue progressivement chez la souris jeune. Le même profil est observé chez les souris âgées, mais, l'induction apparaît moins importante et la diminution plus rapide. Il est

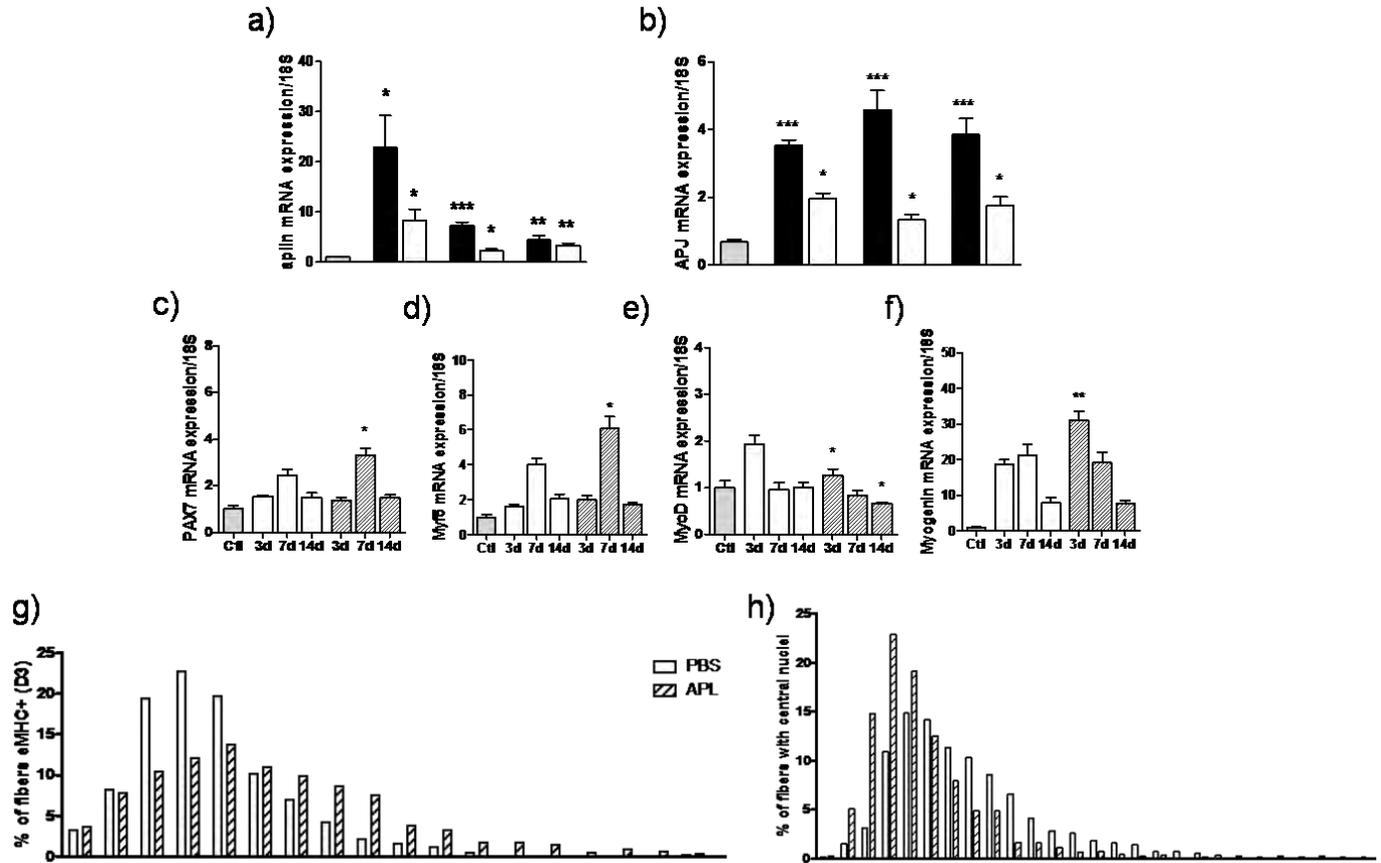


Figure 6 : Rôle et régulation de l'apeline au cours de régénération musculaire.

a) Expression génique de l'apeline au cours de la régénération musculaire chez les souris de 4 mois (barres noires) et de 24 mois (barres blanches) et d'APJ, chez les souris jeunes et âgées traitées au PBS ou à l'apeline avant et après l'injection jusqu'à l'euthanasie (barres achurées) dans les muscles injectés en CT. **b et c)** expression génique des marqueurs de la différenciation des cellules musculaires : PAX7, Myf5, MyoD, myogénine dans les muscles injectés CTX de souris de 3 mois (**b**) et 24 mois (**c**). **a), b) et c)** Les résultats sont exprimés par rapport au muscle contro-latéral (injecté au PBS). **d)** des coupes transverses de muscles 3 jours après l'injection de CTX ont été immunomarquées par un anti-corp anti-myosine embryonnaire (eMHC). Le graphique représente la fréquence des fibres exprimant la eMHC en fonction de leur surface de section (en μm^2). **e)** le graphique représente la fréquence des fibres ayant un noyau central en fonction de leur surface de section, 14 jours après l'injection de CTX.

intéressant de noter qu'à 3 jours, les cellules présentes qui pourraient potentiellement être responsables de la forte expression de l'apeline, seraient les cellules inflammatoires (bien que ce ne soit pas montré dans la littérature) et les cellules satellites activées et/ou en prolifération. Quant au récepteur APJ, son expression génique montre une forte induction dans les phases précoces suivant l'injection de CTX, et reste constante au moins pendant les deux semaines suivantes chez les souris jeunes. Chez les souris plus âgées, comme l'apeline, l'induction d'APJ est moins importante et diminue légèrement au cours de la régénération (**figure 6b**). Ces résultats montrent donc une diminution de l'expression de l'apeline et de son récepteur au cours de la régénération musculaire chez la souris âgée, légitimant l'étude des effets d'une supplémentation en apeline dans ce contexte.

Au cours de leur activation, de leur prolifération et de leur différenciation, les cellules musculaires satellites expriment différents marqueurs dont nous avons étudiés l'expression. Le traitement à l'apeline montre une induction à J3 de PAX7, marqueur de l'activation des cellules satellites par rapport aux souris traitées au PBS (**figure 6c**). Le même effet est observé sur l'expression des marqueurs de la différenciation Myf5 et myogénine (**6d et f**). Par contre, MyoD apparaît moins exprimé, mais il est possible que le pic d'induction soit plus précoce et donc non visible aux temps que nous avons étudiés (J3, J7 et J14).

Ces résultats ont été confirmés par l'étude de coupes histologiques de ces muscles, sur lesquelles nous avons apprécié d'autres marqueurs de la régénération. Parmi eux, la surface des fibres exprimant la myosine embryonnaire (eMHC+) 3 jours après l'injection (**figure 6g**) et celle des fibres contenant un noyau central (**figure 6h**). Plus les fibres exprimant la eMHC+ sont de surface importante et plus, elles se trouvent dans des états avancés de la différenciation, or, à J3, les muscles de souris traitées à l'apeline présentent des fibres marquées de plus gros calibre (**figure 6g**). De la même façon, au cours de la différenciation, lorsque les myoblastes fusionnent en myotubes, les noyaux prennent une position centrale, puis se déplacent en périphérie au cours des phases terminales. La **figure 6h** montre qu'avec le traitement apeline, les fibres possédant un noyau central sont de plus gros calibre que les celles issues des souris traitées au PBS.

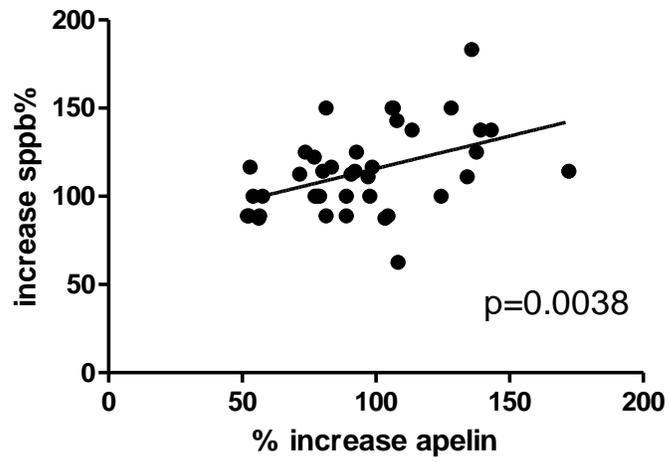


Figure 7: Corrélation entre la capacité à augmenter les taux d'apeline plasmatique entre le temps 0 et le temps 6mois et le score SPPB.

Cette étude montre pour la première fois que l'apeline stimule la régénération musculaire. L'étude des mécanismes sous jacents est en cours et une des études préliminaires que nous avons engagée montre que le traitement à l'apeline en cours de différenciation stimule la fusion des cellules musculaire humaines en culture (non montré). Par la suite, nous étudierons également l'effet de l'apeline sur l'activation des cellules et leur prolifération.

D] L'apeline : biomarqueur du succès d'un exercice chez la personne âgée ?

En complément des dosages d'apeline plasmatique réalisés sur la cohorte d'individus jeunes et âgés, nous avons établi une collaboration avec le Pr Marco Pahor de l'université de Gainesville (Floride, USA) afin de doser l'apelinémie d'individus âgés inclus dans un essai clinique visant à promouvoir une pratique sportive régulière (Etude LIFE-P). Cette intervention consistait en la pratique d'exercice physique (marche, étirements, levée de poids légers,...) trois fois par semaine pendant 12 mois. Le groupe contrôle ne faisait pas d'activité physique mais suivait un programme d'éducation et de sensibilisation au vieillissement musculaire (nutrition, déplacement, ...). Lors de cette étude, il a pu être montré que la population qui avait suivi une pratique sportive présentait en moyenne un bénéfice au niveau de la masse et de la force musculaire. Cependant, au sein du groupe d'individus ayant pratiqué un sport pendant 12 mois, certains ne présentaient pas d'amélioration de leurs paramètres mesurés par le score SPPB. Comme le montre la figure 7, nous avons pu corrélérer le score SPPB, et donc le succès d'un exercice physique à 12 mois, avec la capacité des individus à augmenter leur apelinémie basale au cours des 6 premiers mois d'exercice. A partir de ces observations, il nous a paru intéressant de considérer l'apeline comme un biomarqueur du vieillissement musculaire. Plus particulièrement, ses variations et la capacité à augmenter l'apeline circulante en réponse à un exercice. Dans ce sens, il serait nécessaire d'observer et de tenter de corrélérer la capacité de production de l'apeline par le muscle d'un individu âgé et ses chances de succès en terme de masse et de force musculaire au cours d'un exercice.

CONCLUSIONS / PERSPECTIVES

Mes travaux de doctorat ont montré pour la première fois un lien entre l'apeline et le vieillissement musculaire.

En effet, le vieillissement s'accompagne d'une diminution des taux d'apeline plasmatiques chez les souris et les hommes. Cette observation suscite plusieurs questions. Tout d'abord, de quel(s) isoforme(s) de l'apeline s'agit-il ? Les dosages protéiques au niveau du plasma sont réalisés à l'aide d'un kit ELISA (Phoenix) qui reconnaît potentiellement un antigène commun à toutes les formes d'apeline (13, 17 et 36). Il nous est donc impossible à l'heure actuelle de conclure mais la spectrométrie de masse pourrait être envisagée pour distinguer les différentes formes présentes [305]. Ensuite, quels sont les mécanismes conduisant à la diminution de l'apeline circulante ? Deux possibilités sont envisageables : la première est une diminution de la production par les tissus potentiellement sécréteurs d'apeline comme le muscle, le tissu adipeux et le cœur. La deuxième hypothèse est une augmentation de la dégradation du peptide, notamment par l'ACE2. Or, bien que les taux d'ACE2 plasmatiques n'aient pas été mesurés dans le cadre du vieillissement, des études montrent une diminution dans les poumons de rats âgés [311] et dans le cerveau de souris SAMP8 (modèle murin de vieillissement accéléré) [312]. De façon intéressante, l'équipe de Brandan a récemment mis en évidence une augmentation de l'ACE2 au cours de dystrophie musculaire [313], suggérant un lien entre ACE2 et la fonction musculaire même s'il n'apparaît pas applicable au vieillissement.

Ensuite, nous avons montré que l'apeline était régulée par la contraction musculaire, et que cette régulation était altérée chez le sujet âgé. Au niveau du muscle squelettique, en dehors des cellules musculaires, nous n'avons pas d'élément pour identifier d'autres types cellulaires capables de produire de l'apeline. Plusieurs cellules présentes dans le muscle comme les fibroblastes [249], les cellules endothéliales [314] et inflammatoires [315] expriment le récepteur APJ et sont des cibles de l'apeline. Cependant, aucun élément ne nous permet actuellement de penser que ces cellules sont capables de produire et de sécréter de l'apeline. Des études de tri cellulaire pourraient nous permettre d'isoler les différents types cellulaires du muscle et ainsi de mieux déterminer quelle cellule est responsable de cette production d'apeline.

Dans ce travail, nous avons également montré que la supplémentation en apeline améliore les altérations musculaires liées au vieillissement et nous pensons que cet effet nécessite l'activation de la voie AMPK/Akt/mTOR.

Afin, de confirmer l'implication du récepteur APJ dans les effets de l'apeline sur le muscle il conviendrait de traiter à l'apeline des souris APJ^{-/-} ou bien de traiter les souris avec de l'apeline associée à un « antagoniste » du récepteur comme le F13A (mentionné dans l'introduction) pour vérifier si l'on bloque ainsi des effets de l'apeline sur le muscle. Ensuite, lorsque nous nous sommes intéressés aux mécanismes sous-jacents, nous nous sommes naturellement orientés vers les cibles connues de l'apeline comme l'AMPK et PGC-1 α . Cependant il nous est apparu qu'il était important d'envisager d'autres voies potentielles. C'est dans cet optique que nous avons réalisé un *micro-array* qui a révélé d'autres pistes touchées par la traitement à l'apeline telles qu'une diminution de l'inflammation, notamment des marqueurs macrophagiques (F4/80, CD11b) et de la sénescence (p16). Il sera intéressant d'explorer ces nouvelles cibles et notamment d'établir si le lien est direct ou indirect avec le traitement à l'apeline.

Nous nous sommes concentrés sur l'effet de l'apeline sur les cellules musculaires, or un effet sur la vascularisation ou l'innervation est envisageable. En effet, bien que ces effets aient été observés avec des doses plus importantes que celles présentées dans ce manuscrit, il est possible que le traitement à l'apeline stimule l'angiogénèse. Cependant, il sera important de l'évaluer puisque jusqu'à ce jour, le seul indice que nous ayons est que le traitement à l'apeline n'augmente pas l'expression génique du facteur de croissance endothélial VEGF ou de son récepteur (non montré). D'autre part, l'innervation joue un rôle primordial dans le muscle. Comme nous l'avons vu dans l'introduction, le vieillissement est accompagné d'une dénervation, en partie responsable de l'atrophie musculaire et du changement de répartition des fibres musculaires. Comme un rôle neuro protecteur de l'apeline a déjà été montré [259], il serait intéressant d'évaluer l'effet de l'apeline sur les jonctions neuro musculaires par exemple dont la morphologie peut être observée par marquage immunohistochimique des récepteurs à l'acétylcholine [316].

Enfin une supplémentation en apeline stimule la régénération musculaire induite par une lésion (CTX). Bien que les mécanismes ne soient pas totalement élucidés, il est

admit que les capacités de régénération d'un muscle diminuent avec le vieillissement. Cependant, l'impact de cette altération sur la masse et la fonction musculaire des sujets âgés est discuté. Ces interrogations sont soutenues par une étude innovante montrant que les souris « déplétées » en cellules satellites ne présentent aucune altération musculaire particulièrement marquée au cours du vieillissement par rapport aux souris contrôles [317]. En effet, la régénération musculaire permet au muscle de se reconstruire en cas de lésion comme les traumatismes (fractures, opérations chirurgicales) ainsi qu'au cours de l'exercice physique. Dans des conditions basales et sans stimulation, les cellules satellites sont dans un état de quiescence, or dans leur étude, Fry et ses collaborateurs n'ont pas soumis les souris à une situation faisant appel à de la régénération. Or, contrairement à la souris de laboratoire, l'être humain, au cours de sa vie fait quotidiennement appel aux capacités de régénération des muscles stimulés par des traumatismes. La personne âgée, bien que moins active dans son quotidien donc moins exposée que les jeunes à ces problèmes de régénération, récupère moins bien suite à une lésion musculaire. L'intérêt qu'apporte l'apeline sur la régénération est celui d'une supplémentation aigue et transitoire dans un contexte particulier au cours duquel ce mécanisme est sollicité.

En conclusion, ce projet de recherche fait de un candidat potentiel dans la prise en charge du vieillissement musculaire par une double approche en termes de biomarqueur et de cible thérapeutique.

Tout d'abord, l'apeline apparaît régulée par l'exercice physique. Mais plus précisément, nous pensons qu'il existe une boucle de régulation entre la contraction musculaire et la synthèse de l'apeline, qui par un effet autocrine, participe au maintien de l'homéostasie musculaire. Chez le sujet âgé, cette régulation semble altérée mais pas irréversible puisque les cellules musculaires issues de souris ou de sujets âgés possèdent toujours la capacité de produire de l'apeline.

Ainsi, la diminution de la quantité d'apeline mesurée associée à l'élévation du seuil de stimulation anabolique pourrait expliquer la perte progressive de la masse et la fonction musculaire.

De plus, comme le montre l'investigation menée chez les sujets de l'étude LIFE, la capacité d'un individu âgé à augmenter son apeline plasmatique en réponse à une

stimulation (ici l'entraînement physique) est corrélée aux bénéfices que lui apporte l'entraînement. Autrement dit, il semblerait que nous ayons mis en évidence un moyen simple et efficace pour évaluer la résistance anabolique des sujets. En pratique clinique, cela pourrait se traduire par un test d'effort et l'évaluation de l'augmentation de l'apelinémie en réponse à l'activité physique. Le but étant de proposer une prise en charge adaptée aux patients. En effet, les sujets dans l'incapacité d'augmenter leur apelinémie, pourraient se voir proposer une supplémentation en plus de l'exercice physique afin d'augmenter l'apelinémie, sans nécessiter des intensités d'exercices trop importantes sur le long terme pour une population fragile.

Pour appuyer cette hypothèse, nous avons réalisé un protocole avec des souris de 3, 12 et 24 mois pratiquant un entraînement physique quotidien sur tapis roulant. Une partie de ces souris étaient soumises à un entraînement physique pendant 28 jours associés à un traitement à l'apeline. De façon intéressante, les souris subissant le double traitement ont montré une fatigabilité réduite des muscles squelettiques (*plantaris* et *tibialis* antérieur) en réponse à une succession de contraction induite par stimulation électrique du nerf sciatique par rapport aux souris traitées au PBS (non montré).

Par ailleurs, en pratique clinique, la supplémentation en apeline pourrait s'envisager autrement que par un traitement pharmacologique chez des patients déjà poly médicamenteux. En effet, notre équipe a montré que les cellules musculaires de souris pouvaient sécréter de l'apeline en réponse à un traitement à l'EPA. Des adaptations de l'alimentation allant dans ce sens pourraient également participer à la compensation de la diminution de l'apeline.

En conclusion, l'apeline apparait ainsi comme un nouvel outil clé dans la prise en charge du vieillissement pour l'identification des sujets à risque ainsi que la prise en charge de ces individus afin d'améliorer leurs conditions de vie et retarder la dépendance.

Materiel et méthodes

Animaux

Les souris sont hébergées en accord avec les principes et directives de l'institut médial de la recherche. Les souris wild-type (WT) C57 Black 6/J de 3 à 24 mois sont fournies par le Laboratoire Janvier (St-Berthevin, France). Les souris AMPK dominant négatif (AMPK-DN) ont amicalement été léguées par le laboratoire du Pr. Birnbaum (Université de médecine, Pennesylvanie). Les souris déficientes en apeline (knock-out, $apln^{-/-}$) ont été générées comme décrit précédemment [289] et croisées avec des C57Bl6/J WT 10 fois. Les souris déficientes en APJ (knock-out APJ $^{+/-}$) ont été obtenues par un croisement entre des souris hétérozygote pour la mutation sur APJ et des WT (Deltagen, San Carlos, CA, USA). Les animaux sont hébergés dans une salle à température (20-22°C) et humidité (50-60%) constantes avec un cycle jour-nuit et 12/12h et un accès libre à l'eau et la nourriture.

Immunofluorescence sur tissus et fibres musculaires isolées

Des immunofluorescences ont été réalisées sur des coupes transverses de 10µm de muscle squelettique (soleus et plantaris) cryocongelé. La typologie musculaire a été réalisée grâce aux anti-corps primaires anti-Myosine I, IIa (DHSB, university Iowa), laminine (abcam) et des anticorps secondaires alexa fluor de chez life science. Les images ont été prises par le scanner nanozoomer Hamatsu et l'analyse morphométrique, réalisée à l'aide d'une macro à façon sur ImageJ.

Des immunofluorescences ont été réalisées sur fibres isolées de muscle squelettique (EDL). Les muscles ont été digérés par de la collagénase I (sigma) ; puis les fibres ont été récupérées, fixées, perméabilisées et marquées par un anti-corps primaire anti-apeline (à partir de lapin immunisé Covalab). Les images ont été obtenues par un microscope à fluorescence confocal LSM510 (Zeiss).

Quantification de l'ADN mitochondrial

Les ADN totaux ont été extraits des muscles squelettiques des souris. Le contenu en ADN mitochondrial est mesuré en utilisant le ratio d'un gène mitochondrial (COX1) par rapport à un gène nucléaire (cyclophiline A) comme précédemment décrit [318].

Activité enzymatique Citrate synthase et aconitase

Les activités enzymatiques de la citrate synthase [319] et de l'aconitase [320] ont été évaluées selon un protocole déjà décrit sur mitochondries isolées de muscles squelettiques de souris.

Supplémentation en apeline

Injection quotidienne intra-péritonéale : des souris de 3 à 24 mois WT, 12 mois *ap1^{-/-}* et AMPK-DN ont été injectées quotidiennement avec de la (Pyr)-apeline-13 (Phoenix, Biotech) à la dose de 0,5 $\mu\text{mol/kg/j}$ pendant 28 jours. Les souris contrôles du même âge et/ou génotype ont été injectées en parallèle avec le véhicule (PBS). Toutes les souris ont été euthanasiées 24h après la dernière injection d'apeline.

Sur-expression d'apeline par un vecteur AAV (Adeno-Associated Virus) : le gène de l'apeline est intégré au génome d'un AAV sous la dépendance du promoteur de la luciférase avec entre les deux une séquence de peptide clivable et une séquence de sécrétion. Les souris de 24 mois ont été rasées avec de la crème dépilatoire et anesthésiées par injection i.p d'un mélange de kétamine (10mg/kg)/Xylazine (125mg/kg). Les vecteurs Apeline et contrôle sont injectés en intra-musculaire dans le *tibialis* antérieur et le gastrocnémien des deux pattes arrières (10^{11} vg/muscle). L'intégration du virus et sa réplication est suivie toutes les semaines suivant l'injection à travers l'activité enzymatique de la luciférase par bioluminescence (Caméra Ivis SPECTRUM). Après l'injection, une semaine est nécessaire pour obtenir l'intégration du vecteur et sa production maximale, puis 4 semaines sont comptées pour l'imprégnation des tissus à l'apeline, les souris sont euthanasiées 5 semaines après l'injection.

Dosage plasmatique d'apeline

Dans le plasma extrait des prélèvements de sang, l'apeline est dosée par ELISA (Phoenix Pharmaceuticals, Belmont CA).

Entraînement physique sur tapis roulant

L'entraînement physique aiguë est réalisé sur tapis roulant pendant 30 minutes, à 65 % de leur vitesse maximale (préalablement évaluée) en pente montante inclinée à 10%. L'entraînement chronique correspond à la répétition de l'entraînement aiguë 6j/7 pendant 28 jours.

Evaluation des performances physiques *in vivo*

La force musculaire est évaluée par *grip test*, les souris posées sur leurs 4 pattes sur une grille reliée à un dynamomètre. Elles sont tirées 5 fois, et la force d'agrippement qu'elles développent est enregistrée. Le résultat retenu correspond à la moyenne des 5 valeurs ramenée au poids corporel des souris [126]. La résistance musculaire est mesurée par le test de suspension, les souris sont agrippées la tête en bas, sur une grille suspendue, le temps de suspension est relevé [321]. L'endurance et les capacités de course sont évaluées sur tapis roulant, la vitesse de course est progressivement augmentée de 5cm/sec toutes les 2 minutes jusqu'à épuisement de la souris.

La contraction des muscles *plantaris* et *tibialis* antérieur est évaluée in situ en réponse à la stimulation électrique du nerf sciatique [322]. Sous anesthésie générale des souris, les tendons distaux des deux muscles d'intérêts sont détachés de l'os et reliés à un capteur de force par un fil de soie. La stimulation du nerf sciatique entraîne la contraction du muscle, dont la force développée est enregistrée par le capteur de force connecté à un ordinateur (LabChart, ADInstrument).

Différence veino-artérielle

Un cathéter est placé dans l'artère carotide gauche et dans la veine fémorale gauche de souris sous anesthésie générale. Le sang est ainsi prélevé pendant 10 minutes en basal. Ensuite, la contraction musculaire est induite par stimulation électrique du nerf sciatique, à la fréquence d'une contraction toutes les 2 secondes pendant 10 minutes.

Régénération musculaire induite par cardiotoxine

La lésion musculaire a été réalisée comme précédemment décrit [323] par injection intramusculaire de cardiotoxine (CTX) dans le *tibialis* antérieur et le gastrocnémien gauche, tandis que les muscles de la patte droite sont injectés avec du PBS, sous anesthésie générale. Les souris injectées sont traitées par apeline (0,5µmol/kg/j) ou PBS. Les souris sont euthanasiées 3, 7 ou 14 jours après l'injection. Les muscles d'intérêts (injecté CTX et controlatéral) sont prélevés et coupés en deux, une partie pour mesurer les ARNm et l'autre congelé pour faire des cryocoupes et suivre la reconstruction des muscles grâce à un marquage Hemalun-Eosine.

Cellules

Deux lignées de cellules musculaires issues d'un individu âgé de 19 ans (lignée 155) et d'un individu de 79 ans (379) sains nous ont été données par le Dr V. Mouly (GENETHON, Paris).

Patients

MAPT (Multidomain Alzheimer Preventive Trial): 144 patients de la cohorte MAPT (1680 sujets de plus de 70 ans, Pr Vellas, Gérontopôle, CHU-Toulouse [324]) ont été sélectionnés selon leur participation à la collection biologique (prélèvement sanguin) et à l'examen DEXA au cours de l'étude. Un index de sarcopénie a été établie pour chacun des patients en tenant compte de la MMA/taille² (Masse maigre appendiculaire) et de la masse grasse (Index de Newman, [325]). Les patients ont ensuite été classés en 4 groupes en fonction de la sévérité de la sarcopénie. L'apeline dans les plasmas des patients des deux groupes extrêmes.

LIFE (Lifestyle intervention and Independence For Elders): il s'agit d'une étude américaine de 135 sujets âgés de 70 à 89 ans, sédentaires présentant un risque de mobilité réduite mais capables de marcher 400 mètres [326]. L'apeline a été dosée dans les plasmas des sujets ayant pratiqués un entraînement physique pendant 1 ans, au début et à la fin du protocole.

Rôle et régulation de l'apeline dans
**les troubles cognitifs post-
opératoires (TCPO)**

INTRODUCTION

Une collaboration tripartite entre notre laboratoire, le service d'anesthésie du CHU de Toulouse du Pr Minville et l'équipe de recherche sur la cognition animale du Pr Frances nous a amené à nous interroger sur **le rôle potentiel de l'apeline au cours du vieillissement cérébral** et plus particulièrement lors de troubles cognitifs post-opératoires (TCPO).

Les progrès techniques permettent de réaliser des opérations chirurgicales sous anesthésie générale de longue durée chez des patients de plus en plus âgés et fragiles. Cependant, ces actes chirurgicaux associés à une anesthésie peuvent s'accompagner de troubles cognitifs. Ces troubles sont divisés en 3 catégories selon leur délai d'apparition : 1/ les troubles cognitifs survenant durant la phase de réveil, 2/ les troubles précoces ou *delirium* survenant dans la semaine qui suit l'intervention et 3/ les TCPO survenant après 7 jours. Contrairement aux deux premiers, les manifestations cliniques de TCPO sont plus tardives et leur diagnostic nécessite la comparaison pré et post-opératoire des performances à l'aide d'une batterie de test neuropsychologiques standardisés. Ces troubles peuvent se manifester sous forme d'asthénie (extrême fatigue), de difficultés de concentrations, de troubles mnésiques ou de difficulté d'élocution. L'incidence de ces derniers augmente dans la population de personnes âgées. Ainsi, dans les 3 mois suivant l'opération, elle est de 7% chez des patients âgés de 60 à 69 ans et de 14% chez les plus de 70 ans. Jusqu'à présent, les principaux facteurs de risques identifiés sont l'âge, la durée et le type d'anesthésie [327]. Dans certaines chirurgies, comme la fracture de hanche, l'incidence peut atteindre 35% en moyenne. Néanmoins, la prévalence diminue avec le temps puisque seulement 1% de TCPO persistent 1 an après l'intervention [327].

Les mécanismes responsables de ces troubles sont encore mal connus. Cependant, la littérature apporte quelques éléments de réponse avec notamment une inflammation chronique au niveau de l'hippocampe qui a pu être mise en cause du fait de son implication dans les processus de mémoire [328]. En effet, lors d'une chirurgie de fracture du tibia chez la souris, un déficit cognitif associé à une augmentation plasmatique et hippocampique de la cytokine pro-inflammatoire IL1- β a été observée chez ces animaux β [328].

De plus, l'anesthésie et la chirurgie provoquent une réponse inflammatoire systémique chez les rats âgés [329]. Des molécules de dommages tissulaires (alarmines), sont ainsi libérées dans la circulation systémique et entraînent une perméabilité de la barrière hémato-encéphalique (BHE). L'ouverture de la BHE permet aux cytokines et alarmines périphériques d'entrer dans le système nerveux central, provoquant ainsi une neuroinflammation. L'agression qui en découle est susceptible alors d'amputer le capital cognitif et d'induire la survenue de TCPO [329].

Comme nous l'avons mentionné dans l'introduction de ce manuscrit, le couple apeline/APJ est très bien représenté dans le cerveau et tout particulièrement dans des régions associées à l'apprentissage et à la mémoire comme l'hippocampe, les amygdales et le cortex cérébral [252] [253] [330]. Par ailleurs, des travaux ont montré que le système apelinergique est un régulateur négatif de l'AMPc intracellulaire, crucial pour l'apprentissage et la mémoire dans ces tissus [331] [254]. Enfin, nous avons également évoqué le rôle de neuro-protection de l'apeline qui semblait dû à une action anti-inflammatoire.

L'ensemble de ces données nous ont donc conduit à investiguer le rôle de l'apeline au cours de TCPO chez la souris et chez l'homme au cours du vieillissement. Pour cela nous avons tenté de répondre à deux questions :

1/ Un traitement à l'apeline permet-il de prévenir ou réverser les TCPO chez des souris jeunes et âgées ?

2/ L'apeline centrale et périphérique est-elle régulée au cours d'une opération chirurgicale sous anesthésie chez la souris et l'homme?

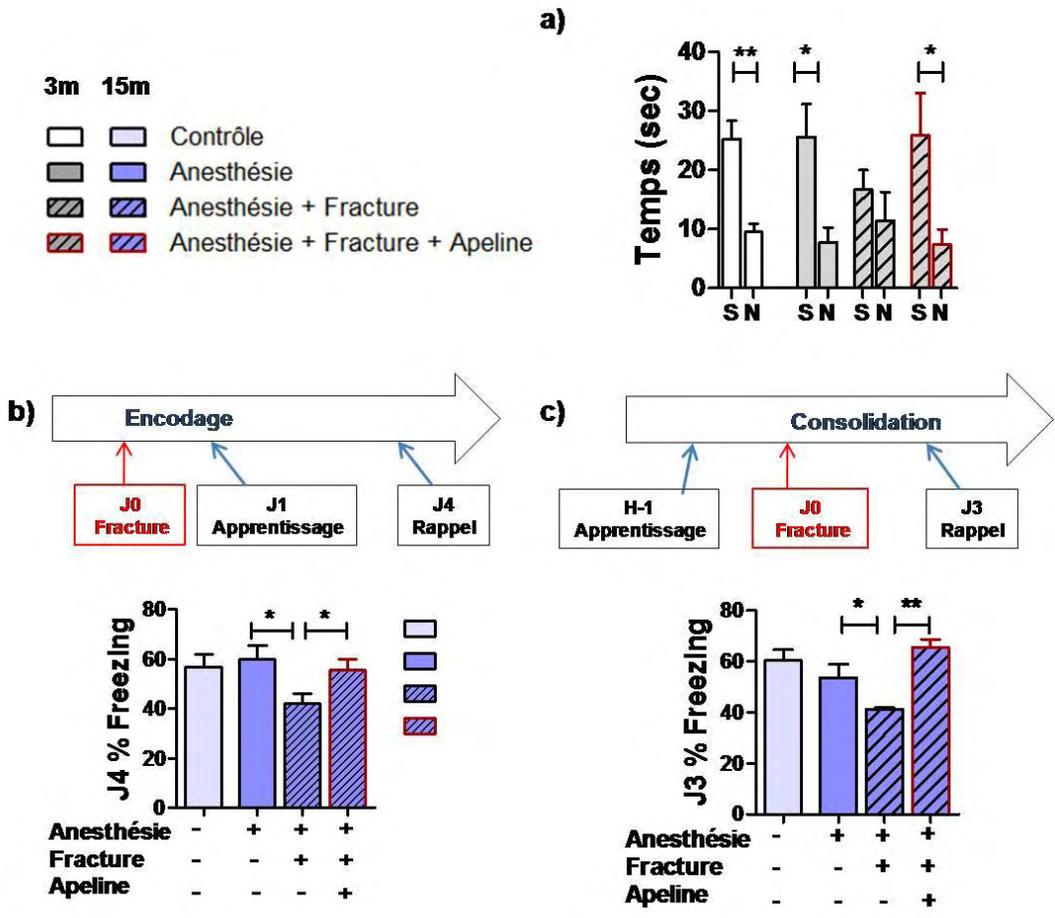


Figure 1 : Effet de l'apeline sur la consolidation (A et B) et l'encodage de la mémoire (C et D) chez les souris jeunes et âgées

a) : Test de navigation spatiale de Morris : durant une phase d'apprentissage, les souris (4 mois) mémorisent la présence d'une plateforme flottante placée au Nord de la plateforme. Après fracture (ou pas pour les souris contrôles) et traitement à l'apeline en intra-péritonéal (0,5 mol/kg/j) (ou PBS), les souris sont replacées dans la piscine et le temps qu'elles passent à chercher la plateforme (absente) est mesuré. Les 4 points cardinaux sont utilisés, seuls les Sud et Nord sont représentés comme exemple.

b et c) : test de conditionnement à la peur ou *fear conditioning* : au cours d'une première phase d'apprentissage, les souris (âgées de 15 mois) sont placés dans une cage où elles vont recevoir 2 chocs électriques. La phase de rappel 3 jours après consiste à remettre les souris dans la même cage et mesurer le temps qu'elles passent immobiles (freezing) en état d'alerte, prête à recevoir les chocs.

b) : La fracture a lieu avant la phase d'apprentissage, permettant d'évaluer l'influence qu'elle a sur l'encodage. Et **c)** : La fracture a lieu entre la phase d'apprentissage et de rappel, ce qui permet d'évaluer la consolidation de la mémoire.

A] Un traitement à l'apeline permet-il de prévenir les TCPO chez des souris jeunes et âgées ?

a. Validation du modèle murin de TCPO

Une fracture osseuse au niveau du tibia est réalisée sous anesthésie générale avec le même gaz utilisé pour les anesthésies des patients dans la majorité des opérations chirurgicales cliniques (Sevoflurane 4%). Tout d'abord, les souris de 4 et 15 mois ayant subi une anesthésie seule (sans fracture) ne montrent aucune altération de la mémoire hippocampique testée par la représentation spatiale de morris et le conditionnement à la peur (*fear conditioning*) (**figure 1**). Ensuite, dans le test spatial, les souris non fracturées (contrôles) passent 2,5 fois plus de temps dans la zone Nord, où était la plateforme lors de la phase d'apprentissage, que dans les autres (Sud, Est, Ouest). Au contraire, les souris fracturées passent autant de temps à chercher la plateforme dans les 4 compartiments (Nord, Sud, Est, Ouest). De même, au cours du *fear conditioning*, faisant appel à la mémoire hippocampique, les souris âgées fracturées passent moins de temps en alerte (% freezing) que les souris contrôles ou seulement anesthésiées montrant une altération de la phase d'encodage (**figure 1b**) et de consolidation (**figure 1c**) de la mémoire suite à la chirurgie.

Ces résultats nous permettent tout d'abord de valider que la chirurgie de fracture sous anesthésie entraîne des troubles de la mémoire hippocampique (les phases précoces et tardives) qui s'apparentent à des TCPO. **De plus, l'anesthésie en elle-même ne montre aucun effet secondaire sur le comportement.** Ce point est essentiel puisqu'en clinique, la part de responsabilité de l'anesthésie et de la chirurgie dans la survenue des TCPO n'est pas élucidée, nous apportons donc ici un premier élément de réponse.

La **figure 1** montre que chez des souris jeunes (4 mois) et âgées (15 mois), un traitement i.p à l'apeline pendant 3 jours avant et après l'opération à une dose de 0.5 $\mu\text{mol/kg/jour}$, prévient la perte des capacités mémorielles. En effet, les animaux traités à l'apeline présentent des tests cognitifs comparables aux souris contrôles non fracturées (**figure 1**).

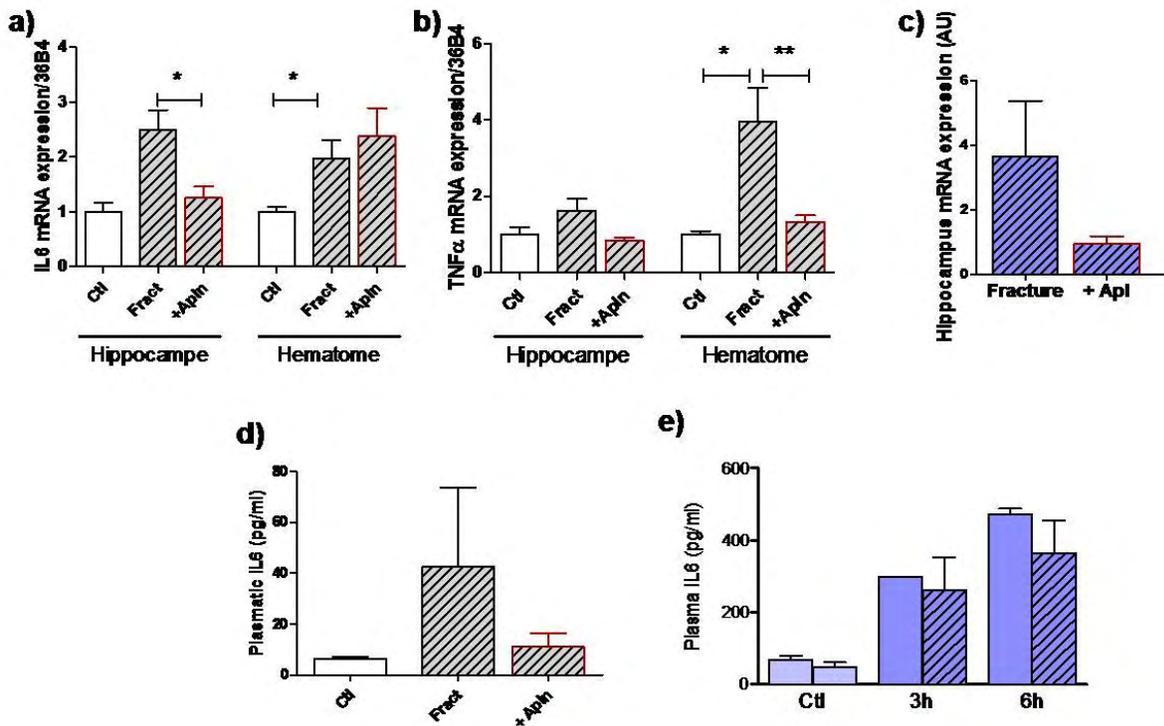


Figure 3 : Effet de l'apeline sur l'inflammation centrale et périphérique au cours des TCPO chez les souris jeunes et âgées et chez l'homme.

a et b : Expression génique d'IL6 et TNFα dans l'hippocampe et au niveau du foyer de fracture (hématome) de souris de 4 mois contrôles (barres blanches), fracturées (barres hachurées) et fracturées et traitées à l'apeline avant l'opération et pendant les 3 jours qui suivent (*: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$)

c : Expression génique d'IL6 dans hippocampe de souris âgées de 15 mois, 6 heures post-opératoires avec ou sans traitement à l'apeline.

d : Concentration plasmatique d'IL6 de souris de 4 mois, 1 jours après la chirurgie.

e : Cinétique précoce de concentration plasmatique d'IL6, avant la chirurgie, 3 et 6h après.

b/ Effets comportementaux de l'apeline sur les TCPO

L'apeline semble donc empêcher la survenue de troubles cognitifs post-opératoires chez les souris jeunes et âgées. Les tests de *fear conditioning* utilisés permettent d'étudier la mémoire hippocampique et nous montrons ici, que l'apeline est capable de prévenir des altérations de deux grandes phases de la mémoire chez la souris âgées: l'encodage et la consolidation.

c/ Effet anti-inflammatoire de l'apeline

Afin de déterminer par quelle action l'apeline pouvait empêcher la survenue de TCPO, nous nous sommes intéressés à un potentiel anti-inflammatoire sur 2 sites d'action : l'hippocampe et le site de fracture.

Au niveau central, l'opération chirurgicale de fracture du tibia a entraîné une inflammation au niveau de l'hippocampe. En effet, la **figure 3 (a et b)** montre l'induction de l'expression génique d'IL6 et de TNF α suite à la fracture. Le traitement des souris à l'apeline en pré et post opératoire empêche l'inflammation au niveau hippocampique (**figure a et b**). De même, chez les souris âgées, la **figure 3c** montre un niveau d'expression génique hippocampique d'IL6 bien moins élevé chez les souris traitées que chez les contrôles dans les phases très précoces, 6h après l'opération.

Au niveau périphérique, on retrouve un profil inflammatoire similaire à celui retrouvé au niveau central dans l'hippocampe. Chez les souris jeunes, l'opération chirurgicale s'accompagne d'une inflammation locale illustrée par l'augmentation génique de TNF α et IL6 au niveau du foyer de fracture (tissu osseux) (**figure 3 a et b**). Bien que l'administration de l'apeline en pré et post opératoire ne modifie pas l'expression d'IL6, elle abolie complètement l'augmentation de TNF α . De plus, les taux circulants d'IL6 sont doublés suite à l'opération chirurgicale et cette augmentation est inhibée suite au traitement à l'apeline (**figure 3 d**). Chez les souris âgées, dans les phases très précoces après la chirurgie, on observe une augmentation forte et rapide des taux d'IL6 dans le sang. En effet, la **figure 3e** montre que le traitement à l'apeline **tend à limiter cette inflammation circulante**, bien que, cette étude préliminaire ne

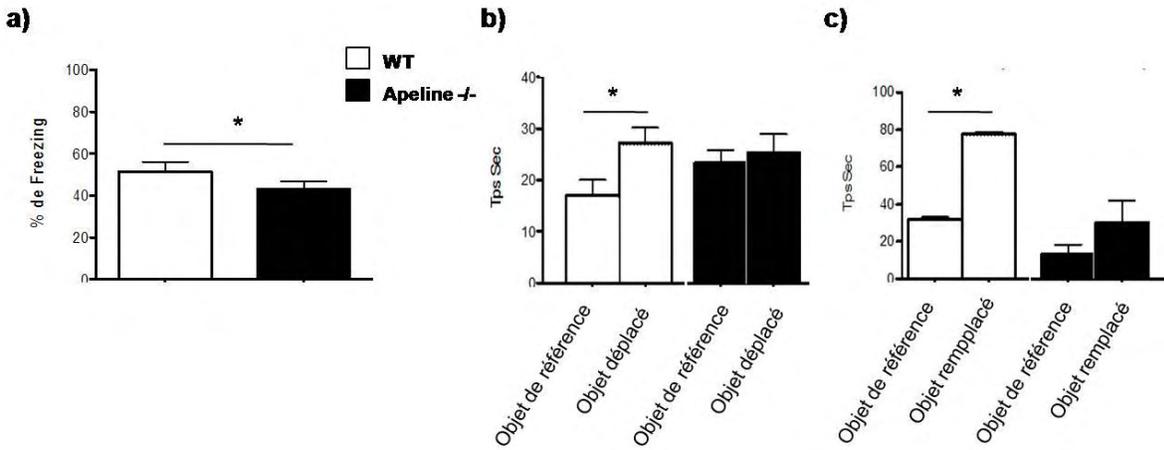


Figure 4 : Fonction mnésique des souris déficientes en apeline (*apl^{-/-}*)

a : Test de *fear conditioning* : lors de la phase de rappel, le temps que la souris passe immobile en état d'alerte est mesurée comme indice de mémoire hippocampique

b Objet déplacé (mémoire hippocampique): lors d'une phase d'apprentissage, les souris sont exposées à un nouvel objet, lors de la phase de rappel, la moitié des souris retrouve le même objet au même endroit et l'autre moitié fait face au même objet, placé à un autre endroit. Le temps de flairage de l'objet est mesuré.

c : Objet remplacé (mémoire non-hippocampique) : le test de reconnaissance d'objet est réalisé à la différence que durant la phase de rappel, l'objet est remplacé par un nouvel.

contient pas suffisamment d'animaux pour conclure.

La supplémentation en apeline des souris jeunes et âgées présente un effet anti-inflammatoire au niveau de l'hippocampe ainsi que de la circulation sanguine. Par contre, au niveau local du foyer de fracture, semble moins clair puisque traitement inhibe l'expression de TNF α mais pas d'IL6. Ces résultats indiquent d'une part, un effet anti-inflammatoire de l'apeline au niveau central et périphérique, d'autre part, que l'injection périphérique d'apeline entraîne des modifications au niveau central.

d/ Effet mnésique de l'apeline chez les souris déficientes en apeline.

Pour aller plus loin dans la compréhension de l'effet de l'apeline dans la prévention des TCPO, nous avons étudié l'impact du manque l'apeline sur la mémoire dépendante ou non de l'hippocampe chez des souris déficientes en apeline (apeline knock-out, *apln*^{-/-}). Durant le test de *fear conditioning*, évaluant la mémoire hippocampique spatiale, les souris déficientes passent moins de temps en état d'alerte, suggérant qu'elles n'ont pas retenu le choc électrique auquel elles avaient été soumises durant la phase d'apprentissage (**figure 4a**). Au cours du test de reconnaissance d'objet déplacé, les souris contrôles passent beaucoup plus de temps à flairer l'objet déplacé que celui qui n'a pas bougé, ce qui témoigne de l'utilisation de leur mémoire spatiale dépendante de l'hippocampe (**figure 4b**). Au contraire, les souris déficientes en apeline ne montrent pas de différence de comportement face aux deux localisations de l'objet.

Les souris déficientes en apeline présentent donc une altération de la mémoire hippocampique. Pour aller plus loin, nous avons testé l'influence du manque d'apeline sur un test faisant appel à la mémoire indépendante de l'hippocampe. Au cours du test de reconnaissance d'objet, les souris déficientes ne montrent pas de différence de comportement face à un objet qu'elles ont déjà vu, contrairement aux souris contrôles (**figure 4c**). L'apeline semble importante dans le processus de mémoire, qu'elle soit dépendante ou non de l'hippocampe.

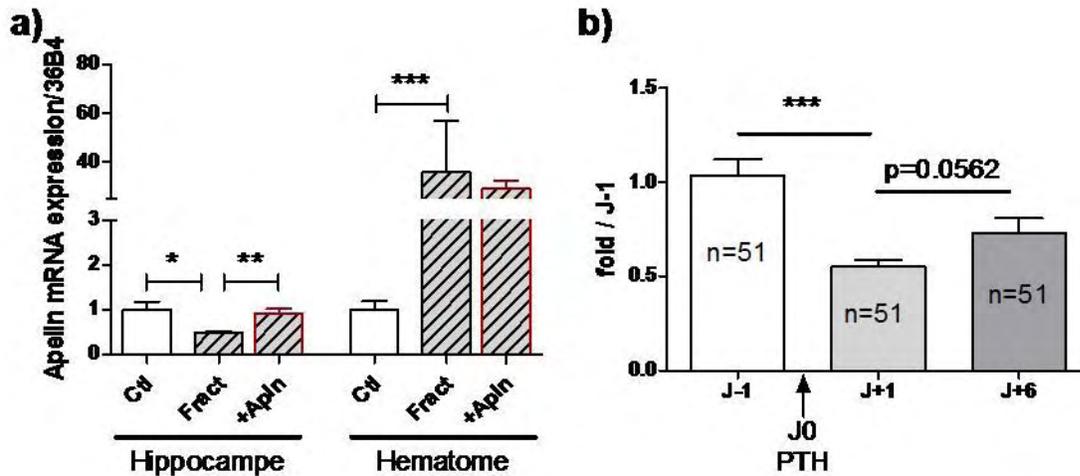


Figure 5 : Régulation centrale et périphérique du couple Apeline/APJ au cours des TCPO chez la souris et l'Homme.

a et b : Régulation génique d'apeline (**a**) et APJ (**b**) au niveau hippocampique et dans la zone de fracture chez les souris (hématome) de souris de 4 mois contrôles (barres blanches), fracturées (barres hachurées) et fracturées et traitées à l'apeline avant l'opération et pendant les 3 jours qui suivent (barres hachurées bordées de rouge).

C : Concentration plasmatique d'apeline, avant et après une opération chirurgicale de remplacement de prothèse de hanche (PTH) chez l'homme (*: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; *** : $p < 0.001$).

B] L'apeline centrale et périphérique est-elle régulée au cours d'une opération chirurgicale sous anesthésie et des TCPO ?

a/ Chez la souris jeune et âgée

L'apeline étant un peptide endogène dont la supplémentation péri-opératoire protège de la survenue des TCPO, il était important d'étudier sa régulation centrale et périphérique au cours de la chirurgie et de la survenue des TCPO.

De façon surprenante, l'apeline présente chez les souris jeunes de 4 mois, entre le cerveau et la périphérie, une régulation opposée que l'on a évaluée par l'expression génique dans l'hippocampe et le foyer de fracture (tissu osseu) 3 jours après la chirurgie.

Au niveau central, suite à la fracture, l'expression génique de l'apeline est diminuée. Au contraire, **au niveau périphérique**, la fracture est suivie d'une augmentation de l'expression de l'apeline locale (**figure 5**). De façon surprenante, le traitement en périphérie à l'apeline augmente l'expression génique de l'apeline au niveau central, sans modification au niveau de la zone de fracture (**figure 5**). Ces résultats suggèrent une communication entre l'apeline périphérique et le cerveau.

b/ Chez l'homme

Des patients du service de chirurgie orthopédique du CHU de Toulouse devant subir une intervention chirurgicale pour un remplacement de prothèse de hanche ont été prélevés la veille de l'opération (J-1), le lendemain (J+1) et 6 jours après (J+6). La mesure de la concentration en apeline de ces prélèvements montre une régulation au cours du temps, avec une diminution plasmatique précocement après l'anesthésie/chirurgie, qui remonte progressivement dans les jours qui suivent (**figure 5b**).

Ces résultats offrent deux approches pour la suite du projet. Tout d'abord, nous avons remarqué au sein des patients testés que les profils d'apelinémie variaient. En effet, certains patients retrouvent à 6 jours, les taux d'apeline circulants qu'ils avaient avant la chirurgie, alors que d'autres patients ne montrent pas de réelle augmentation de l'apelinémie post-chirurgie. Il apparaît intéressant d'identifier d'autres paramètres qui

distinguent des deux groupes de patients, ainsi que de voir l'incidence de la survenue des TCPO dans chacun des groupes.

Conclusion/Perspectives :

Ce travail collaboratif nous a permis de développer un modèle murin de troubles cognitifs post-opératoires dans le laboratoire. Nous avons également mis en évidence pour la première fois un effet protecteur de l'apeline sur la survenue de ces troubles que ce soit chez les souris jeunes ou âgées. De plus, nous apportons quelques éléments de réponse sur les mécanismes sous-jacents, bien qu'ils soient encore à approfondir. En effet, l'apeline semble limiter l'inflammation hippocampique, causes connues de la survenue des TCPO. Ces résultats sont en accord avec *Yang et al.* qui montrent un effet neuroprotecteur de l'apeline au niveau de l'hippocampe *via* une action anti-inflammatoire [286]. De façon intéressante, une mauvaise prise en charge de la douleur est un facteur de risque de TCPO chez l'homme [327] or le traitement à l'apeline des souris opérées montre un effet analgésique (non montré dans ce manuscrit), potentiellement consécutif à une diminution de l'inflammation.

Au niveau mécanistique, la fracture induit une diminution des taux d'apeline centrale et la supplémentation périphérique en apeline stimule la synthèse hippocampique du peptide. Ces observations nous permettent d'émettre l'hypothèse que le traitement périphérique à l'apeline diminue l'inflammation hippocampique de deux façons possibles. D'une part, l'apeline pourrait passer la barrière hémato-encéphalique, en condition normale c'est une propriété évoquée mais qui à ce jour n'est pas totalement démontrée. Cependant, dans un contexte d'inflammation il a été montré qu'une inflammation périphérique modifiait la perméabilité de la BHE et pourrait potentiellement laisser passer l'apeline [329]. D'autre part, l'augmentation d'apeline périphérique peut entraîner de façon indirecte l'augmentation de l'apeline hippocampique. Au total, il pourrait exister un cycle de régulation : La fracture entraîne une inflammation périphérique et centrale associée à une diminution centrale d'apeline. Il est donc envisageable qu'au niveau de l'hippocampe, l'inflammation inhibe l'expression génique d'apeline, qui ne peut pas jouer son rôle anti-inflammatoire, restaurer par la supplémentation.

Les expériences entreprises chez l'homme montrent qu'en clinique, la chirurgie est également associée à des modifications de la régulation de l'apeline. Nous avons remarqué que le profil apelinémique au cours de la chirurgie varié selon les patients. En effet, bien que chez les majorités des sujets, la chirurgie s'accompagne d'une baisse de l'apelinémie, certains voient leur taux plasmatiques totalement restaurés dans les jours qui suivent, tandis que chez d'autres, une apelinémie basse persiste au moins une semaine après la chirurgie. Ces observations soulèvent l'hypothèse d'un lien entre les modifications des taux d'apeline circulante au cours de la chirurgie et des phases précoces post-opératoires et la survenue de TCPO. Pour tester cette hypothèse, nous avons mis en place une étude clinique nous permettant d'évaluer: 1/ les fonctions cognitives de patients avant et dans les semaines suivant une chirurgie cardiaque afin d'identifier les patients présentant des TCPO et 2/ les taux d'apeline plasmatique. Dans un premier temps nous pourrions vérifier si les modifications d'apelinémie sont spécifiques à un type d'opération (remplacement de hanche ou chirurgie cardiaque). De plus, cette étude nous permettra de mettre en évidence un potentiel lien entre les variations d'apelinémie au cours de la chirurgie et la survenue des TCPO. Dans ce cas, les variations plasmatiques d'apeline péri-opératoires pourraient considérer comme un biomarqueur de la survenue des TCPO.

En conclusion, l'inflammation locale est nécessaire à la cicatrisation des tissus après une chirurgie, tandis que l'inflammation centrale est délétère pour les fonctions cognitives. L'objectif à terme, pourrait être de compléter les personnes âgées à risque de développer des TCPO en apeline au cours d'une chirurgie permettant de cibler l'inflammation hippocampique, ce qui serait une alternative à l'utilisation d'anti-inflammatoires déconseillés chez les personnes âgées. De plus, l'identification de ces patients en fonction de leur apelinémie péri-opératoire pourrait être envisagée pour optimiser la prise en charge des patients à risques de troubles cognitifs post-opératoires.

CONCLUSIONS PERSPECTIVES

Nos travaux montrent que chez les souris, l'apeline est libérée par le muscle lors de sa contraction et semble agir de façon autocrine afin de stimuler la biogénèse mitochondriale des cellules musculaires ou encore de favoriser la différenciation des cellules musculaires striées squelettiques. Par ailleurs, l'apeline est également capable de stimuler la régénération musculaire en ciblant les cellules satellites. L'ensemble des actions de l'apeline ont donc en faveur d'une amélioration de la physiologie musculaire. Cependant, nous avons également mis en évidence que le cycle de régulation de l'apeline par la contraction était altéré au cours du vieillissement. Ainsi, comme le montre le phénotype âgé prématuré des souris déficientes en apeline, le vieillissement musculaire pourrait en partie être dû à une altération des capacités de production d'apeline par la cellule musculaire.

Parmi les nombreuses molécules mises à jour par la recherche fondamentale montrant des effets bénéfiques dans les modèles physiopathologiques expérimentaux (rongeurs, cellules en culture), la grande majorité s'est révélée décevante lorsqu'elles ont été testées en phase clinique (resveratrol, DHEA pour le vieillissement). Les différents rôles de l'apeline sur le muscle squelettique, mis en évidence dans notre équipe depuis 10 ans, ont très rapidement conduit à des études translationnelles, puis à des études cliniques portées par notre laboratoire, ce qui en fait une molécule intéressante pour une utilisation en thérapeutique humaine. Chez le sujet âgé, le dosage plasmatique de l'apeline dans la cohorte de l'étude LIFE, a permis de confirmer une régulation de l'apeline par l'exercice physique que nous avons mise en évidence dans les cellules humaines en culture et les souris âgées. Une collaboration avec le Dr Fabien Pillard (service de médecine du sport, CHU-Toulouse) nous permet de doser l'apeline dans les plasmas de patients jeunes et âgés en réponse à différents types d'exercice, aigu, chronique, modéré ou intense. Ces expériences sont en cours et nous permettrons d'affiner la compréhension des mécanismes de la régulation de l'apeline par l'exercice physique chez l'homme. Par exemple, est-ce que l'augmentation d'apelinémie est corrélée à l'intensité ou au type de l'exercice physique (vélo, course à pied) ?

Comme cité dans l'introduction, le système apelinergique est largement exprimé dans l'organisme et impliqué dans de nombreuses pathologies. Le vieillissement étant commun à toutes les cellules de l'organisme et compte tenu des effets bénéfiques que nous avons obtenus sur le muscle nous avons exploré les rôles de l'apeline au cours du

vieillessement d'autres organes comme le cerveau dans un contexte de troubles cognitifs post-opératoires.

Il émerge donc un nouveau concept de biomarqueur, qui consiste à étudier la capacité d'un individu à compenser la diminution de l'apeline (au cours du vieillissement musculaire ou d'une chirurgie). Il en ressort, un axe préventif et thérapeutique. En effet, dans le cadre des TCPO, il s'agirait de supplémer les patients avant et après une chirurgie pour compenser et donc empêcher les variations d'apelinémie afin de prévenir la survenue de TCPO par l'effet anti-inflammatoire de l'apeline exogène. Par contre, dans un contexte de sarcopénie, l'apeline s'intègre dans une prise en charge préventive et/ou thérapeutique, puisque son maintien par une activité physique régulière, ou l'alimentation (EPA) [264], pourrait permettre le maintien de la masse et de la fonction musculaire au cours du temps, ou du moins de retarder l'apparition des altérations liées au vieillissement. Enfin l'intervention pourrait devenir thérapeutique pour réverser ou ralentir des altérations déjà installées dans le cas d'une prise en charge tardive. Enfin, du fait de son effet pro-régénératif sur le muscles squelettique, l'apeline pourrait être utilisée de façon aigue pour stimuler la reconstruction musculaire suite à une lésion (chirurgie, hématome) ou une immobilisation (alitement).

Le vieillissement, se caractérise par des poly pathologies entraînant des co morbidités qui aggravent le pronostic clinique. C'est là que réside la difficulté pour les équipes soignantes de considérer plusieurs pathologies dans la prise en charge d'un patient âgé. Il apparait donc primordial de considérer cette nécessité de prise en charge globale du vieillissement, afin d'améliorer les conditions de vie et de conserver l'indépendance des sujets âgés. La force de la considération de l'apeline dans le vieillissement réside dans son action globale, bien que mon projet de thèse se soit principalement articulé autour du vieillissement musculaire, il s'est vite ouvert à d'autres pistes comme le vieillissement du cerveau et du rein (non mentionnée dans ce manuscrit).

ANNEXES

COMMUNICATIONS

COMMUNICATIONS ORALES :

Toulouse, Juin 2015: Les après-midis du PA3S (Pôle Aliment, Sécurité Sanitaire et Santé). « *L'apeline, un nouveau candidat dans la prise en charge du vieillissement musculaire* ».

Boston, Avril 2015: ICFSR (International Conference on Frailty and Sarcopenia Research). « *Apelin, a new potential strategy against sarcopenia* ».

Nantes, Janvier 2015 : AFERO (Association Française d'Etude et de Recherche sur l'Obésité) : « *L'adipokine apeline restaure les altérations musculaires liées à l'âge* ». *Prix de la communication* ».

Toulouse, 2012: Société Française d'Endocrinologie (SFE). « *Le cycle apeline-glucose dans l'absorption intestinale de glucose* ». »

COMMUNICATIONS ECRITES:

Barcelone, Mars 2014: ICFSR (International Conference on Frailty and Sarcopenia Research). « *Chronic apelin treatment reverses age-induced skeletal muscle dysfunction in mouse* ».

ARTICLES

- Besse-Patin A, Montastier E, **Vinel C**, Castan-Laurell I, Louche K, Dray C, Daviaud D, Mir L, Marques MA, Thalamas C, Valet P, Langin D, Moro C, Viguier N. Effect of endurance training on skeletal muscle myokine expression in obese men: identification of apelin as a novel myokine. **Int J Obes (Lond.)** 2014;38(5):707-13.

Contribution: Participation à la réalisation des expériences sur l'apeline : qPCR et dosage protéique.

- Dray C, Sakar Y, **Vinel C**, Daviaud D, Masri B, Garrigues L, Wanecq E, Galvani S, Negre-Salvayre A, Barak LS, Monsarrat B, Burlet-Schiltz O, Valet P, Castan-Laurell I, Ducroc R. The intestinal glucose-apelin cycle controls carbohydrate absorption in mice. **Gastroenterology.** 2013 144(4):771-80.

Contribution: Participation aux expériences de reviewing.

Rancoule C, Attané C, Grès S, Fournel A, Dusaulcy R, Bertrand C, **Vinel C**, Tréguer K, Prentki M, Valet P, Saulnier-Blache JS. Lysophosphatidic acid impairs glucose homeostasis and inhibits insulin secretion in high-fat diet obese mice. **Diabetologia.** 2013 Jun;56(6):1394-402.

Contribution: Réalisation des expériences de transport de glucose dans le muscle squelettique ex vivo.

Tajan M, Batut A, Cadoudal T, Deleruyelle S, Le Gonidec S, Saint Laurent C, Vomscheid M, Wanecq E, Tréguer K, De Rocca Serra-Nédélec A, **Vinel C**, Marques MA, Pozzo J, Kunduzova O, Salles JP, Tauber M, Raynal P, Cavé H, Edouard T, Valet P, Yart A. LEOPARD syndrome-associated SHP2 mutation confers leanness and protection from diet-induced obesity. **Proc Natl Acad Sci.** 2014. 111(42):E4494-503.

Contribution: Réalisation des expériences de transport de glucose dans le muscle squelettique ex vivo.

The Intestinal Glucose–Apelin Cycle Controls Carbohydrate Absorption in Mice

CÉDRIC DRAY,^{1,2,*} YASSINE SAKAR,^{3,*} CLAIRE VINEL,^{1,2} DANIELE DAVIAUD,^{1,2} BERNARD MASRI,^{2,4} LUC GARRIGUES,^{2,5} ESTELLE WANECQ,^{1,2} SYLVAIN GALVANI,^{1,2} ANNE NEGRE–SALVAYRE,^{1,2} LARRY S. BARAK,⁶ BERNARD MONSARRAT,^{2,5} ODILE BURLET–SCHILTZ,^{2,5} PHILIPPE VALET,^{1,2} ISABELLE CASTAN–LAURELL,^{1,2} and ROBERT DUCROC³

¹INSERM Unité 1048, Institut des Maladies Métaboliques et Cardiovasculaires, Toulouse, France; ²Université de Toulouse, Université Paul Sabatier, Toulouse, France; ³INSERM Unité 773, Centre de Recherche Biomédicale Bichat Beaujon, CRB3; UFR de Médecine site Bichat Paris 7 - Denis Diderot; IFR02 Claude Bernard, Paris, France; ⁴INSERM UMR1037, Cancer Research Center of Toulouse, Toulouse, France; ⁵CNRS, Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale, Toulouse, France; and ⁶Department of Cell Biology, Duke University Medical Center, Durham, North Carolina

BACKGROUND & AIMS: Glucose is absorbed into intestine cells via the sodium glucose transporter 1 (SGLT-1) and glucose transporter 2 (GLUT2); various peptides and hormones control this process. Apelin is a peptide that regulates glucose homeostasis and is produced by proximal digestive cells; we studied whether glucose modulates apelin secretion by enterocytes and the effects of apelin on intestinal glucose absorption. **METHODS:** We characterized glucose-related luminal apelin secretion in vivo and ex vivo by mass spectroscopy and immunologic techniques. The effects of apelin on ¹⁴C-labeled glucose transport were determined in jejunal loops and in mice following apelin gavage. We determined levels of GLUT2 and SGLT-1 proteins and phosphorylation of AMPK α 2 by immunoblotting. The net effect of apelin on intestinal glucose transepithelial transport was determined in mice. **RESULTS:** Glucose stimulated luminal secretion of the pyroglutaminated apelin-13 isoform ([Pyr-1]-apelin-13) in the small intestine of mice. Apelin increased specific glucose flux through the gastric epithelial barrier in jejunal loops and in vivo following oral glucose administration. Conversely, pharmacologic apelin blockade in the intestine reduced the increased glycemia that occurs following oral glucose administration. Apelin activity was associated with phosphorylation of AMPK α 2 and a rapid increase of the GLUT2/SGLT-1 protein ratio in the brush border membrane. **CONCLUSIONS: Glucose amplifies its own transport from the intestinal lumen to the bloodstream by increasing luminal apelin secretion. In the lumen, active apelin regulates carbohydrate flux through enterocytes by promoting AMPK α 2 phosphorylation and modifying the ratio of SGLT-1:GLUT2. The glucose-apelin cycle might be pharmacologically handled to regulate glucose absorption and assess better control of glucose homeostasis.**

Keywords: Calorie Intake; Mouse Model; Diabetes; Adipokine.

Apelin is the endogenous ligand for the G protein-coupled receptor APJ,^{1,2} acting under several molecular forms ([Pyr-1]-apelin-13, apelin-13, -17, and -36) pro-

cessed from a 77-amino acid precursor.³ The active forms of apelin are present in peripheral tissues, including lungs, heart, adipose, and pancreas (for reviews, see Carpenne et al⁴ and Castan-Laurell et al⁵). In the gastrointestinal tract, messenger RNA (mRNA) apelin-expressing cells were found in rat and mouse stomach, mouse duodenum, and human and mouse colon.^{1,6} APJ immunostaining has also been described in the epithelium, goblet cells, and crypt cells of the small intestine and in the smooth muscle layer of the gastrointestinal tract in the rat.⁷ APJ is also located in the enteric blood vessels.⁷ Thus, the apelin/APJ system may have a potential role in the digestive tract.

Recent studies have established that apelin is involved in glucose homeostasis.⁸ We showed that intravenous injection of physiological doses of apelin decreased glycemia and stimulated glucose uptake in skeletal muscles of lean and obese insulin-resistant mice.⁹ Moreover, apelin-stimulated glucose transport in muscle was dependent on AMP-activated protein kinase (AMPK) activation. Similar results were described in cultured C2C12 myotubes by Yue et al, who also showed that apelin-deficient mice exhibit decreased insulin sensitivity.¹⁰ Taken together, such studies support the assumption that apelin plays a physiological role in glucose metabolism and maintenance of insulin sensitivity.⁸

We showed that leptin and resistin β , two adipokines secreted in the gastrointestinal lumen by gastric and intestinal endocrine cells, regulate the activity of the sugar transporters in enterocytes by an AMPK-dependent mechanism.^{11–13} The net effect of this regulation of hexose transporters was an increase of sugar uptake with significant consequences on splanchnic metabolism. Interestingly, the adipokine apelin shares several features with these peptides, such as (1) the ability to be produced in

*Authors share co-first authorship.

Abbreviations used in this paper: AMPK, AMP-activated protein kinase; BBM, brush border membrane; GLUT2, glucose transporter 2; Isc, short-circuit current; KRB, Krebs–Ringer solution; mRNA, messenger RNA; MS, mass spectrometry; PBS, phosphate-buffered saline; SGLT-1, sodium-glucose transporter 1.

© 2013 by the AGA Institute
0016-5085/\$36.00

<http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2013.01.004>

the gastrointestinal tract, (2) an implication in glucose metabolism, and (3) the control of insulin sensitivity via AMPK.^{10,11} Recent studies brought evidence of a putative regulation of apelin by glucose in different tissues. Indeed, increased amounts of apelin in response to different glucose levels^{14,15} were shown in human endothelial as well as in pancreatic beta cells.

This study was designed to characterize the relationship between apelin and glucose in the intestine. We show that D-glucose specifically promotes [Pyr-1]-apelin-13 secretion in the intestine, and we further show *in vitro* and *in vivo* the capacity of apelin to increase glucose flux from the lumen toward the bloodstream by interacting with the APJ receptor present in enterocytes. This effect appears to involve AMPK-dependent control of sodium glucose transporter 1 (SGLT-1) and glucose transporter 2 (GLUT2) expression in the membrane of apical enterocytes by apelin. Moreover, pharmacologic inhibition of endogenous apelin action by a selective APJ antagonist resulted in a decrease of glycemia, supporting the existence of a glucose/apelin cycle that regulates intestinal absorption of carbohydrates.

Materials and Methods

Animals

Male C57BL/6J mice (Centre Elevage Janvier, Le Genest-St-Isle, France) had free access to water and standard food. They were treated in accordance with European Community guidelines concerning the care and use of laboratory animals.

Nanoflow Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry Analysis

The gastric contents were filtrated with a 10-kilodalton membrane and injected on a NanoRS 3500 chromatographic system (Dionex, Amsterdam, The Netherlands) coupled to an LTQ-Orbitrap XL mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany). Five microliters of each sample was separated on a 75 μ m ID \times 15 cm C18 column (Proxeon Biosystems, Odense, Denmark). Peptides were eluted using a 5% to 50% linear gradient of solvent B in 105 minutes (solvent A was 0.2% formic acid and solvent B was 0.2% formic acid in 80% ACN). Full mass spectrometry (MS) scans were acquired in the Orbitrap on the 300–2000 *m/z* range with the resolution set to 60,000. An inclusion list corresponding to several charge states (2+, 3+, 4+) of [Pyr-1]-apelin-13 was used to select these ions for CID fragmentation, and the resulting fragment ions were analyzed in the linear ion trap (LTQ, Thermo Fisher Scientific). Dynamic exclusion was used within 60 seconds to prevent repetitive selection of the same peptide.

Fluorescence Immunohistochemical Studies and Confocal Microscopy

Immunohistochemical staining was performed as previously described¹³ using anti-APJ polyclonal antibody (1/100; Novus Biologicals, Littleton, CO), anti-apelin polyclonal antiserum (1/200; Covalab, Villeurbanne, France), and anti-GLUT2 antibody (1/100; Abcam 54460, Paris, France). Nuclei were stained with TOPRO-III (1/1000; Invitrogen, Saint Aubin, France). Fluorescence analysis was performed using an LSM510 confocal laser scanning microscope (Zeiss, Le Pecq, France). Samples were visualized with a 25 \times objec-

tive lens (Plan-Apochromat, N.A. 1.4, oil) and excited using 3 laser lines (488, 543, and 633 nm). For APJ and GLUT2 detection, control was achieved using an immunoglobulin G mouse serum at the same concentration as the antibody. The specificity of apelin immunostaining was tested using primary antisera preabsorbed with an excess amount of homologous antigen ([Pyr1]-Apelin-13, 10⁻⁶ mol/L). Densitometric quantifications of fluorescence intensity were assessed by ImageJ software. The results represent the apelin-integrated density – (total area \times mean fluorescence of background) of 3 different pictures per mouse and 4 mice per group.

Tissue Preparation and Short-Circuit Measurement

Mice were fasted for 16 hours and killed. The proximal jejunum was dissected, and adjacent samples were mounted in Ussing chambers. The tissues were bathed with Krebs–Ringer solution (KRB) with 10 mmol/L glucose at 37°C (pH 7.4) and gassed with 95% O₂/5% CO₂. Electrogenic ion transport was monitored as previously described.¹¹ KRB alone (vehicle) or containing apelin (10⁻¹⁰ to 10⁻⁶ mol/L) was added in the mucosal bath 2 minutes before challenge with 10 mmol/L glucose. Similar tests were performed with 100 nmol/L apelin incubated overnight at 4°C with 1/100 rabbit polyclonal antibody raised against apelin (Covalab).

Transport of Transmural Hexoses

The experiments were performed using jejunal sacs from fasted mice. The proximal jejunum was dissected and rinsed in cold saline solution. Jejunal sacs (4 cm long) were prepared for D-[1-¹⁴C] glucose (49.5 mCi/mmol) transport as previously described.¹² The corresponding jejunal sacs were filled with 1 mL of KRB without (control) or with 1 nmol/L apelin and containing 0.02 μ Ci/mL of the isotopic tracer D-[1-¹⁴C] glucose (49.5 mCi/mmol) and glucose to obtain a final concentration of 30 mmol/L. Similarly, we studied paracellular transport with 30 mmol/L mannitol and the isotopic tracer D-[1-¹⁴C] mannitol (59 mCi/mmol) at 0.2 μ Ci/mL.

SGLT-1, GLUT2, AMPK, and APJ Western Blot

Fasted animals were anesthetized and underwent laparotomy for *in situ* experiments. Three jejunal segments (5 cm long) were tied and filled with 3 mL of KRB without (control) or with 1 nmol/L apelin. After 3 minutes of *in situ* incubation, 3 mL of 60 mmol/L glucose solution was injected into the lumen to obtain a final concentration of 30 mmol/L. After a further 5 minutes, these sacs were removed and opened along the mesenteric border and the mucosa was scraped off on ice with a glass blade.

For APJ determination, mice were gavaged with water (control) or [Pyr-1]-apelin-13 (200 pmol/kg in 100 μ L). After 10 minutes, mice were killed and whole intestine was dissected on ice. The total cell protein extracts and the brush border membranes (BBMs) were prepared from the scrapings as previously described.¹¹ Solubilized proteins were resolved by electrophoresis on 10% sodium dodecyl sulfate/polyacrylamide gel electrophoresis, and immunoblotting was performed. The following antibodies were used at a 1:1000 dilution: SGLT-1 (AB 1352; Chemicon International, Temecula, CA) and GLUT2, phospho-AMPK- α 1/2 (Thr172), and AMPK α 1/2 (sc-9117, sc-33524, and sc-25792, respectively; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA); a 1:500 dilution was used for APJ (NLS 64; Novus Biolog-

icals). The intensity of the specific immunoreactive bands was quantified using NIH Image (Scion).

In Vivo Luminal Apelin Secretion

Fasted C57BL/6J mice were orally loaded with 100 μ L of D-glucose solution (0.5 or 1 g/mL) or water (control). After 10 minutes, the mice were killed, the whole intestine was dissected, and the luminal content was gently collected and immediately frozen.

Apelin Secretion and Immunoblotting From Everted Intestinal Sacs

Whole proximal intestine was harvested, rinsed, everted, and filled with phosphate-buffered saline (PBS). Then, 1-cm-long everted intestinal sacs were incubated in gassed and warmed PBS with or without glucose (5 and 30 mmol/L). Fifty microliters of media was collected at 5, 30, and 60 minutes of incubation and immediately frozen in liquid nitrogen before a column filtration step (Amicon Ultra, 10,000 molecular weight cutoff; Millipore, Temecula, CA) and measurement of apelin concentration. To normalize the results obtained, each sac was collected for protein quantification. The same experiments were performed to determine apelin-77 content in jejunal mucosa by Western blotting after 60 minutes with (30 mmol/L) or without glucose in KH buffer incubation. Solubilized proteins were resolved by electrophoresis on 10% sodium dodecyl sulfate/polyacrylamide gel electrophoresis. Apelin-77 (59469; Abcam) and β -actin (13E5; Cell Signaling Technology, Boston, MA) antibodies were used at a dilution of 1:500. The intensity of the specific immunoreactive bands was quantified using NIH Image (Scion).

Effect of Apelin on Oral Glucose Load

Gavages of fasted mice with a D-glucose solution (3 g/kg of body weight) were performed. Glucose load was preceded (10 minutes) by a PBS (control) or a [Pyr-1]-apelin-13 (200 pmol/kg in 100 μ L) gavage. Ten minutes later, mice were anesthetized and the blood was harvested from the hepatoportal vein for glucose (RTU kit; Roche, Meylan, France) and determination of apelin concentration. The same experiments were performed in the presence or absence of the APJ antagonist (1 μ mol/kg in 200 μ L, 10 minutes before glucose load).

APJ-Mediated β -Arrestin 2 Recruitment Measured by BRET Assay

Fasted mice were gavaged with apelin (200 pmol/kg in 100 μ L) or APJ antagonist (1 μ mol/kg in 200 μ L), and the luminal content of the proximal intestine was collected 10 minutes later and immediately frozen in liquid nitrogen. After a step of filtration and purification, the apelin and antagonist activities of the luminal content of PBS-, apelin-, or APJ antagonist-gavaged mice were assessed on β -arrestin 2 recruitment to APJ by BRET. HEK-293T cells were transfected with the human apelin receptor tagged on its C-terminus with the BRET donor Renilla luciferase and β -arrestin 2 double tagged with the yellow fluorescent protein at the N- and C-terminus. The BRET approach was assayed as previously described.¹⁶ Intrinsic activities of filtered luminal contents were measured by adding samples 5 minutes after the Rluc substrate coelenterazine. To determine if the antagonist was still active after gavage, luminal content was added 1 minute after the luciferase substrate and exogenous [Pyr1]-apelin-13 was added 5 minutes before reading.

Apelin Assay

Apelin was quantified with the nonselective apelin-12 EIA kit (Phoenix Pharmaceuticals, Belmont, CA). Before dosage, luminal content, plasma, and conditioned medium were filtered and concentrated by column (Amicon Ultra, 10,000 molecular weight cutoff; Millipore).

Quantitative Polymerase Chain Reaction Experiments

Jejunal loops were incubated during a 24-hour period in warmed oxygenated KRB containing [Pyr1]-apelin-13 (10^{-6} mol/L) or APJ antagonist (5×10^{-6} mol/L) and/or D-glucose (30 mmol/L). After treatment, loops were rinsed in KR buffer and immediately frozen in liquid nitrogen for GLUT2 and SGLT-1 mRNA quantification as previously described.⁹

Chemicals

[Pyr1]-Apelin-13 was purchased from Bachem (Bubendorf, Switzerland), D-[1-¹⁴C] mannitol was from GE Healthcare Amersham Biosciences (Les Ulis, France), and D-[1-¹⁴C] glucose was from Perkin Elmer (Boston, MA). All other chemical reagents were purchased from Sigma (St Louis, MO). Apelin antagonist (C-14-C dicyclic¹⁷) was purchased from Polypeptide (Strasbourg, France).

Statistical Analysis

All results are expressed as means \pm SEM. One-way analysis of variance with Tukey-Kramer multiple comparisons post hoc test was performed using GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA). Significance was set at $P < .05$.

Results

Glucose Increases Luminal Secretion of Apelin In Vitro and In Vivo

Exogenous glucose promotes luminal secretion of apelin when administered by gavage to mice. Indeed, 10 minutes after an oral load with high glucose solutions (50 or 100 mg in 100 μ L of water), the amount of apelin measured in the collected luminal material increased by 2-fold (Figure 1A). This regulation is glucose specific and independent of osmolarity because the same concentration of mannitol did not induce apelin secretion (Supplementary Figure 1). Consequently, as shown in Figure 1B and C, apelin contained in jejunal cell cytoplasm (red) was partially depleted when glucose was given orally, leading to a significant decrease of immunoreactivity. No staining was observed when the same experiments were performed with preabsorbed immune serum (Figure 1B, bottom panel). Taken together, these results suggest that apelin stored in the epithelial cells (Supplementary Figure 2) has been released in the lumen in response to glucose. To confirm this hypothesis, we further quantified apelin secretion ex vivo on everted intestine loops from mouse duodenum and jejunum (Figure 1E and F). Both tissues exhibit the same kinetic apelin secretion profile characterized by a dramatic increase of apelin concentration in the medium 30 minutes after incubation of everted loops with 5 or 30 mmol/L glucose solutions. A similar increase was observed after 60 minutes, suggesting that maximal release of apelin was reached already after 30 minutes. More-

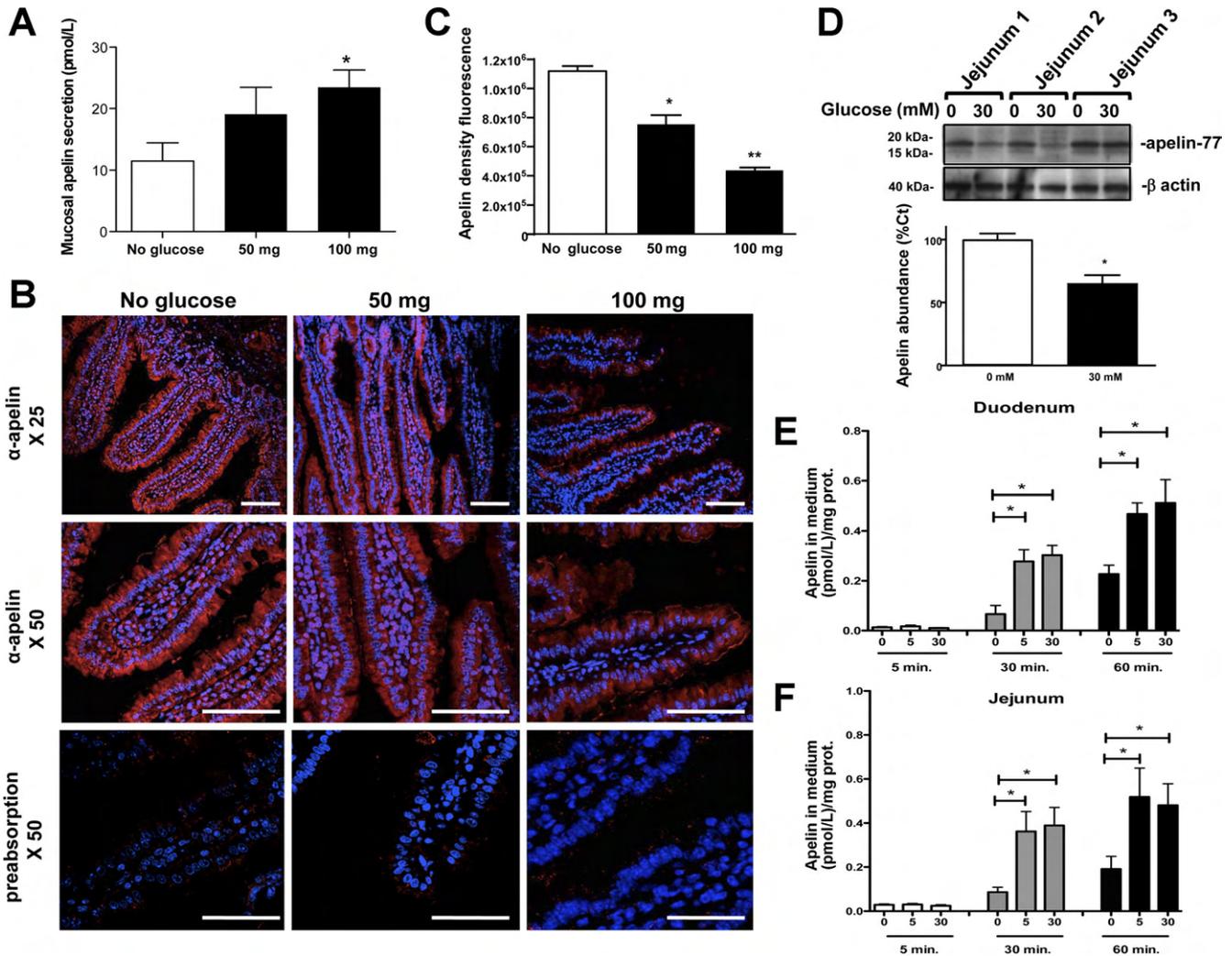


Figure 1. D-glucose triggers intestinal apelin secretion. (A) In vivo apelin secretion measured in luminal fluid collected from the proximal part of the intestine after gavage. $n = 5$; $*P < .05$ vs no glucose. (B) Confocal micrographs ($25\times$ top line and $50\times$ middle line) of jejunum sections from mice treated or not with an oral glucose load (50 and 100 mg in $100 \mu\text{L}$) and stained with anti-apelin immune serum. Immune serum preincubated with an excess of apelin was used as control (bottom line). Bars = $100 \mu\text{m}$. (C) Densitometric quantification of apelin immunoreactivity in jejunum. $n = 4$; $*P < .05$, $**P < .01$ vs. no glucose. (D) Representative immunoblots of intracellular apelin-77 from jejunal sacs from mice treated with 30 mmol/L glucose. Data of densitometric analysis are expressed as relative protein levels (β -actin as control); $n = 3$; $*P < .01$. (E and F) Kinetics of apelin secretion by duodenum or jejunum everted sacs in medium without (0) or with glucose (5 or 30 mmol/L). $n = 5$; $*P < .05$.

over, Western blotting showed an intracellular form of apelin (dimer of apelin-77; 16 kilodaltons) in a jejunal-everted loop incubated for 60 minutes with 30 mmol/L of glucose, corroborating these results and reinforcing a glucose-dependent apelin release (Figure 1D). Then, to determine if immunoreactive quantification of apelin was specific to one isoform, we performed MS analysis of gastric secretions collected from PBS-, apelin-, or glucose-gavaged mice. Because [Pyr-1]-apelin-13 (resulting from a pyroglutamination of apelin-13) is the most stable isoform in aqueous phases, comparisons were performed with a control profile processed with synthetic [Pyr-1]-apelin-13 alone (data not shown and Mesmin et al¹⁸) or added to the luminal content of PBS-treated mice (Figure 2A). Figure 2A shows that after gastric secretions are purified and filtered, spiked synthetic [Pyr-1]-apelin-13 can be recovered by this technique. Figure 2B and E (middle panel) show that after gavage with [Pyr-1]-

apelin-13, the same peptide is recovered in the intestinal lumen of mice after 10 minutes in contrast to mice orally loaded with PBS (Figure 2D). Moreover, after glucose load (1 g/mL), [Pyr-1]-apelin-13 was also detected in gastric secretions (Figure 2C and E, lower panel) to the same extent. Further MS experiments and analysis based on ion signal extraction indicated that other apelin isoforms were not recovered in luminal secretions from glucose-loaded mice when compared with their published MS profile (Supplementary Figure 3).

Exogenous Apelin Binds APJ Receptor Present in BBM of Enterocytes and Controls Abundance of Glucose Transporters in BBM

Because secretion of apelin appears to be controlled by glucose, we investigated the reciprocal role of [Pyr-1]-apelin-13 on enterocyte glucose pathways. We first

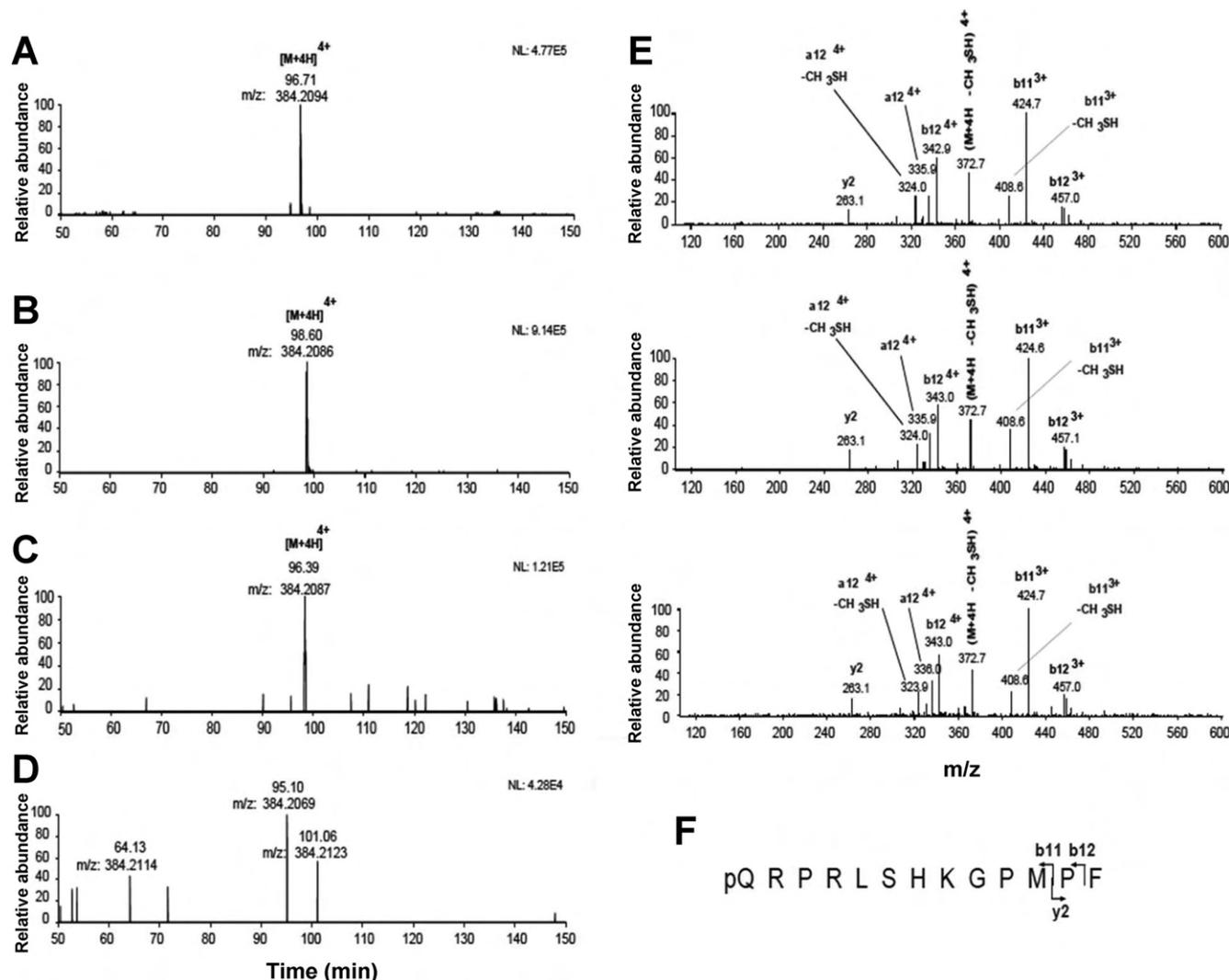


Figure 2. D-glucose induces in vivo [Pyr-1]-apelin-13 isoform luminal secretion. Extracted ion chromatograms of the pQRPRLSHKGPMPF sequence of [Pyr-1]-apelin-13 in gastric secretions of mice gavaged with PBS plus (A) 2 pmol of synthetic [Pyr-1]-apelin-13 added before MS analysis, (B) synthetic [Pyr-1]-apelin-13, and (C) glucose and (D) in gastric secretion of mice treated with PBS. (E) Manually annotated MS/MS fragmentation spectra of the pQRPRLSHKGPMPF peptide obtained from experiments A (upper panel), B (middle panel), and C (lower panel). (F) Sequence of [Pyr-1]-apelin-13.

measured the presence of apelin receptor on the small intestine. Fluorescent immunohistological studies were performed on mouse jejunal mucosa sections, showing that apelin receptor (APJ) is expressed in villi associated primarily with the cell membrane (Figure 3A). No staining was observed when the same experiments were performed with nonspecific immunoglobulin G antibody. Moreover, an immunoreactive signal corresponding to apelin receptor APJ was found by Western blotting in total proteins (Figure 3B) and BBMs (Figure 3C) from mouse enterocytes. A significant signal was found in BBM in basal condition, indicating a constitutive expression of APJ receptor. However, the immunoreactive signal was decreased 3.9-fold ($P = .013$) when [Pyr-1]-apelin-13 was given to the mice (Figure 3C), suggesting effective activation of APJ receptor by exogenous [Pyr-1]-apelin-13 and consequently internalization of APJ.

Intestinal glucose physiology is characterized by post-translational regulation of glucose transporter abundance in BBM. We thus examined ex vivo whether apelin modifies the amount of activity of glucose transporters on jejunal loops. As expected, glucose (10 mmol/L) induced a 2.4-fold increase in SGLT-1 levels in BBM compared with controls (Figure 4A). Apelin (1 nmol/L) alone significantly reduced the basal level of SGLT-1 ($P < .01$) and markedly prevented an increase in glucose in SGLT-1 abundance ($P < .001$) when injected into the loop 3 minutes before glucose (Figure 4A).

The effect of apelin on SGLT-1 activity was then studied using Ussing chambers on mice with the jejunum isolated. As previously described,^{11,12,19} the addition of 10 mmol/L D-glucose to the mucosal bath of the Ussing chamber induced a rapid and marked increase in short-circuit current (Isc) (vs basal conditions), reaching a pla-

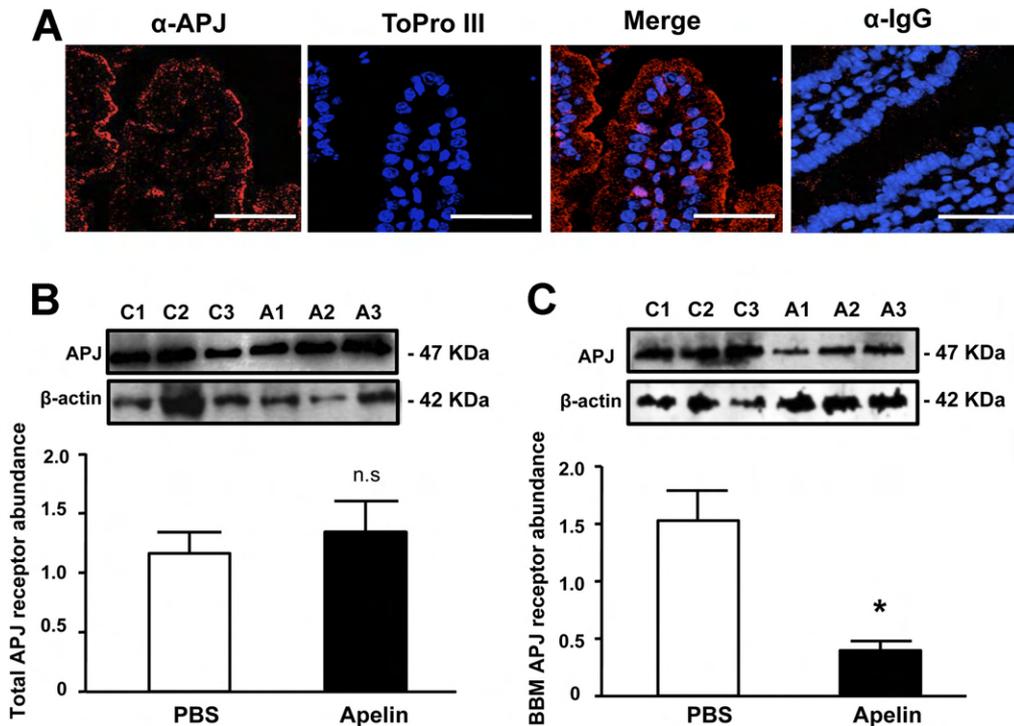


Figure 3. Presence of APJ in enterocytes and activation by apelin. (A) Jejunum sections from mice stained with anti-APJ antibody, ToPro III, or both. Pictures are representative of 4 mice. Control was achieved with nonspecific immunoglobulin G antibodies. Original magnification 50 \times ; bars = 100 μ m. (B and C) Representative immunoblots of APJ and β -actin in jejunum from mice orally loaded by [Pyr1]-apelin-13 (200 pmol/kg) (A1, A2, A3) or PBS (C1, C2, C3). Protein detection was achieved from (B) whole jejunum or (C) BBM purified material. Data of densitometric analysis using β -actin as control. * $P < .05$.

teau after 3 to 4 minutes. Addition of apelin in the mucosal compartment 3 minutes before glucose challenge markedly reduced the glucose-induced Δ Isc. As depicted in Figure 4B, the inhibition of Δ Isc was dose dependent with a maximal inhibition of 0.1 μ mol/L and a half-maximal inhibitory concentration of 0.1 nmol/L. Overnight incubation with apelin antibody totally blocked the inhibitory effect of the peptide (Figure 4C). Because SGLT-1 expression is balanced by GLUT2 expression,¹⁴ the effect of apelin on GLUT2 was studied. Apelin induces a significant increase in the abundance of GLUT2 in BBM ($P < .05$) (Figure 4D). Glucose alone induces a 2.1-fold increase in apical GLUT2 protein and apelin coincubated with glucose resulted in a significant increase in immunoreactive GLUT2 over the value of glucose or apelin alone, indicating an amplification mechanism or additive effects via distinct pathways (Figure 4D).

Because AMPK is a key regulator of glucose transporter in enterocytes, we measured the effect of apelin on the phosphorylation of the AMPK α 2 subunit. Apelin alone significantly stimulated AMPK α 2 phosphorylation (Figure 4E). This effect was less marked when compared with glucose alone; however, when apelin was injected in the jejunal loop together with glucose, the phosphorylation of AMPK α 2 was significantly enhanced, showing an additive effect of apelin and glucose (Figure 4E).

Apelin Stimulates Transepithelial Transport of ¹⁴C-Glucose Through Regulation of GLUT2

Because activation of AMPK α 2 is associated with glucose flux control in enterocytes,¹³ we investigated the effect of [Pyr-1]-apelin-13 on transport of transmural hexoses (Figure 5). As shown in Figure 5A, [Pyr-1]-ape-

lin-13 (1 nmol/L) significantly increased 30 mmol/L glucose uptake in the isolated jejunum in mice. This effect was fast (2 minutes after addition of apelin) and glucose specific. Indeed, no effect on 10 mmol/L mannitol uptake was observed, indicating that the increased transport of glucose induced by apelin was unlikely to be caused by changes in paracellular permeability (Figure 5B). To better understand the pathways of apelin allowing this glucose flux, we performed the same experiment in the presence of phloretin, a GLUT transporter selective inhibitor. The results show that the transepithelial glucose transport stimulated by apelin is significantly decreased to the control value in the presence of the inhibitor, suggesting that GLUT2 translocation is necessary for the effect of apelin (Figure 5C).

Orally Administered Apelin Increases Intestinal Transepithelial Glucose Transport From Lumen to Bloodstream in Mice

The net effect of oral apelin on glucose absorption was further investigated. For that purpose, the consequence of oral administration of [Pyr-1]-apelin-13 on hepatoportal glucose concentration was studied during an oral glucose load in fasted mice. Orally administered apelin dramatically increased glucose concentration in the hepatoportal vein 15 minutes after glucose load (Figure 6A). Then, to show the physiological effect of endogenous apelin production on intestine glucose uptake, we inhibited the glucose/apelin cycle by using a specific APJ antagonist¹⁷ orally administered 10 minutes before the glucose load. Data presented in Figure 6B show that 1 μ mol/kg antagonist promoted a marked reduction of plasmatic glucose 10 and 20 minutes after the glucose

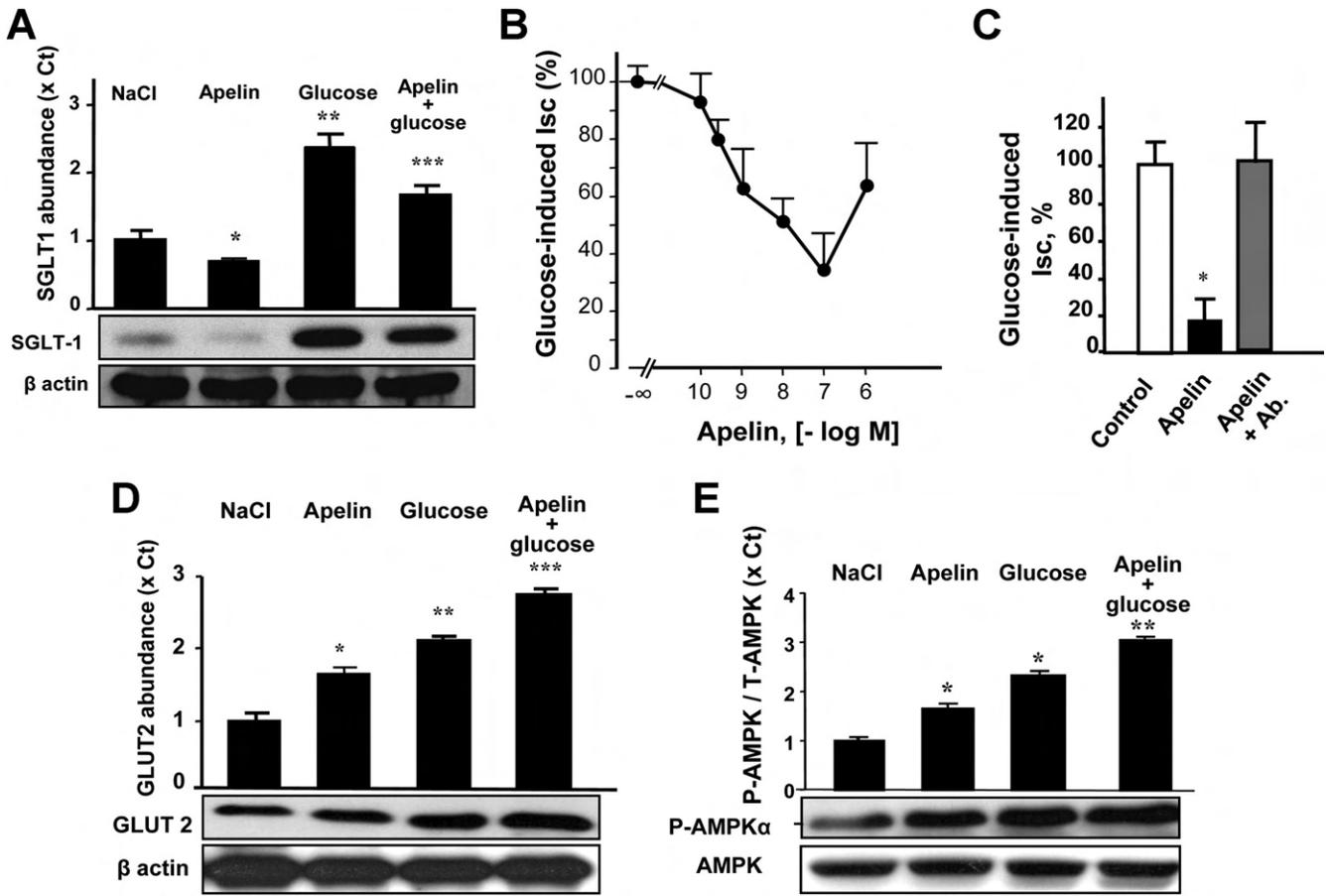


Figure 4. Luminal apelin promotes AMPK phosphorylation and controls the presence of SGLT-1 and GLUT2 in enterocyte BBM. (A) Representative immunoblots of SGLT-1 from jejunal sacs from mice treated with or without [Pyr1]-apelin-13 in association or not with 30 mmol/L glucose. Data of densitometric analysis using β -actin as control. * $P < .05$, ** $P < .01$, and *** $P < .001$ versus NaCl. (B) Effect of luminal [pyr1]-apelin-13 on glucose-induced Isc. Electrogenic sodium transport was followed in mouse jejunum in an Ussing chamber as an index of active glucose transport by SGLT-1. [Pyr1]-apelin-13 was added in a bath 2 minutes before 10 mmol/L glucose. (C) Effect of 10 nmol/L [Pyr1]-apelin-13 on glucose-induced Isc after overnight incubation with an antibody against apelin (Apelin + Ab.) $n = 5-7$ tissues studied. * $P < .05$. (D) Representative immunoblots of GLUT2 proteins in extracts from jejunum mucosa treated with luminal apelin with or without 30 mmol/L glucose. Densitometric analysis of the blots using β -actin as control. * $P < .05$, ** $P < .01$, and *** $P < .001$ versus NaCl. (E) Effect of apelin on phosphorylation of AMPK α 2 in the jejunum. Phosphorylated AMPK α to total AMPK was used for densitometric analysis. * $P < .05$ and ** $P < .01$ vs NaCl.

load. This result clearly indicates that apelin physiologically promotes carbohydrate absorption. Finally, to evaluate the long-term effect of both apelin and APJ antagonist, we studied the consequence of 24-hour treatment on SGLT-1 and GLUT2 mRNA level (Figure 6C). As expected, GLUT2 was significantly increased while SGLT-1 mRNA level was decreased by 30 mmol/L glucose. Apelin had the same effect as glucose on carbohydrate transporter mRNA expression. Such effects were blunted by treatment with the APJ antagonist.

Exogenous Apelin Given by Gavage Remains Active in the Proximal Intestine

To determine if exogenous [Pyr-1]-apelin-13 and APJ antagonist administered orally to mice are still active when they reach the proximal intestine, the luminal content was collected 15 minutes after gavage, purified, filtered, and tested for APJ-inducing β -arrestin 2 recruitment. Supplementary Figure 4 shows control of cell transfection as well as BRET experiment validity

obtained by increasing doses of apelin. Luminal content collected from [Pyr-1]-apelin-13 orally loaded mice displayed a significant rise in BRET signal compared with PBS-treated mice, indicating that orally loaded apelin is active and induces arrestin recruitment to the membrane (Figure 7A). Conversely, when APJ antagonist was given by gavage to mice, the resulting luminal content did not modify basal APJ activity by BRET. Finally, the efficiency of the APJ antagonist collected after gavage was studied on apelin-induced BRET signal (Figure 7B and C). As expected, exogenous [Pyr-1]-apelin-13 added to cells (10^{-7} mol/L and 10^{-6} mol/L; Figure 7B and C, respectively) induced a significant increase in BRET signal. This effect was totally blunted by lumen content from APJ antagonist orally loaded mice when 10^{-7} mol/L exogenous apelin was used (Figure 7B) but not for a higher dose of the peptide (10^{-6} mol/L; Figure 7C). These results show that exogenous [Pyr-1]-apelin-13 and APJ antagonist remain efficient

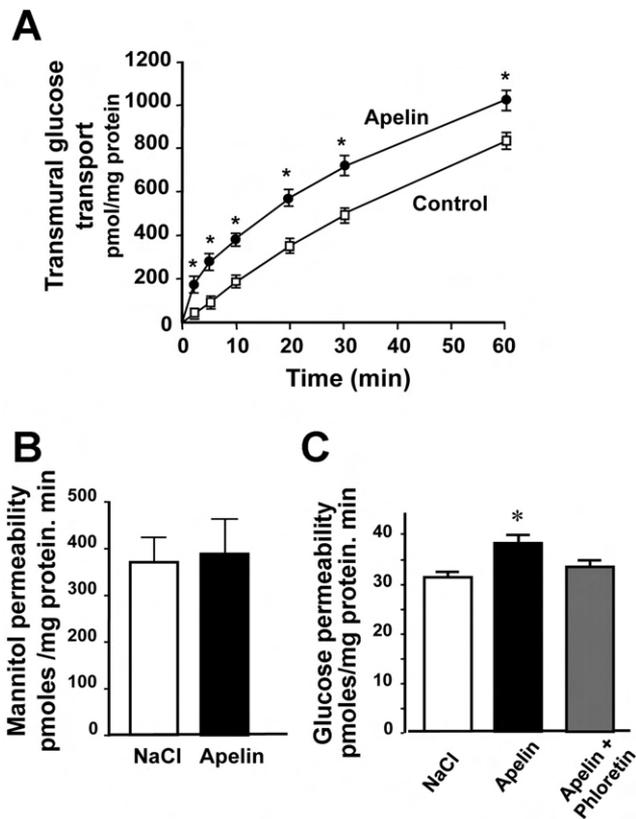


Figure 5. Apelin increases transmural transport of D-glucose in the jejunal sac through GLUT2 control. (A) Kinetic of transmural transport of glucose was performed in jejunal sacs from mice. Intestinal sacs were incubated for 15 minutes with 1 nmol/L apelin (*black circles*) or vehicle (*white squares*) in KRB containing glucose (30 mmol/L) and D-[1-¹⁴C] glucose. Data are representative of 4 experiments. **P* < .05 versus control. (B) Similar experiment with 30 mmol/L mannitol. **P* < .05 versus control. (C) Effect of GLUT2 inhibitor phloretin (1 mmol/L) on apelin-induced glucose transport in jejunal sacs from 4 mice. **P* < .05 vs NaCl.

when they reach glucose absorption zones of the intestine (ie, duodenum and jejunum).

Discussion

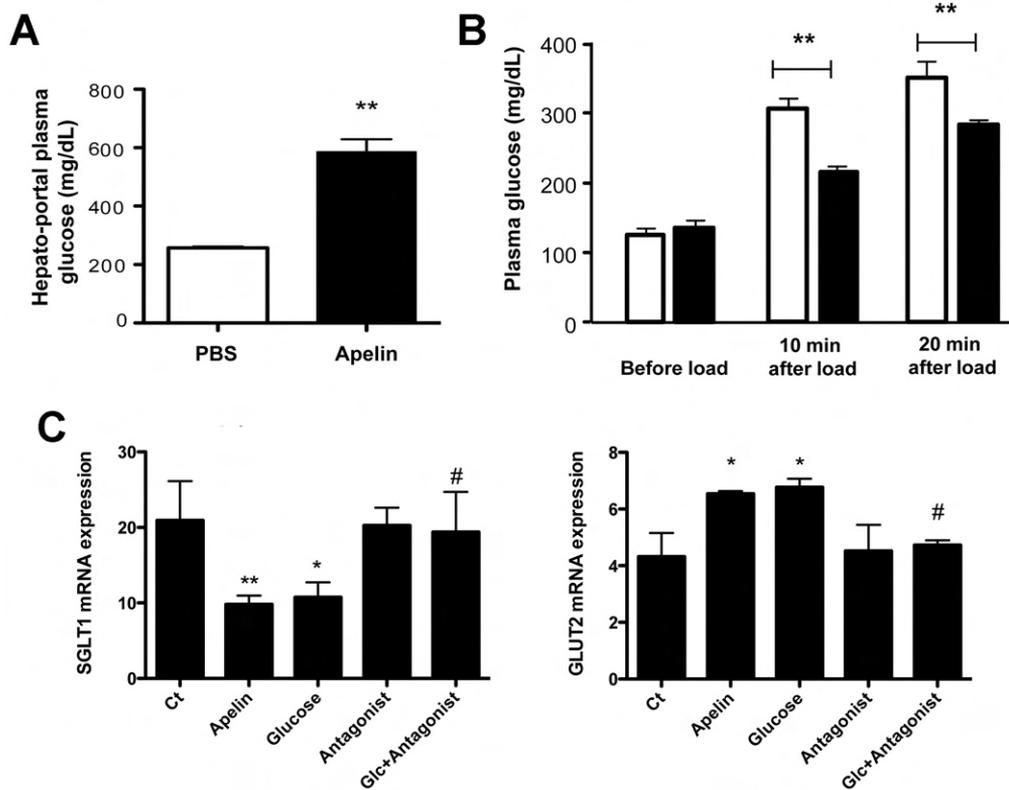
This study shows the presence of a regulatory intestinal loop between apelin and glucose leading to a rapid regulation of intestinal glucose absorption. To ensure balanced glucose absorption during or after a meal, the activity of sugar transporters in the enterocytes appears highly regulated. Indeed, glucose itself is able to promote its own transit through the intestinal barrier toward the bloodstream by a fine regulation of SGLT-1 and GLUT2 abundance in the BBM.²⁰ Recent studies have described other actors of glucose absorption implicating hormones such as cholecystokinin,²¹ angiotensin II,²² insulin,²³ leptin,¹¹ RELM- β ,¹² or GLP1/2.²⁴ Apelin shares characteristic features with these hormones, particularly with leptin, because both are increased with obesity, target the intracellular AMPK, and are closely related to glucose homeostasis and insulin sensitivity through their action on skeletal muscle and adipose tissue.^{9,25} In this study, we showed by different approaches that glucose specifically

enhances [Pyr-1]-apelin-13 secretion from intestine cells into the lumen without modifications in plasma apelin (Supplementary Figure 5). This is in line with our previous demonstration that luminal secretion of gut leptin was observed without any modification of blood leptin levels in the rat.¹³ Even though apelin and glucose have been tightly associated in several studies, the direct effect of glucose on putative apelin secretion has been poorly described. Yamagata et al recently showed that human endothelial cultured cells secrete apelin in response to glucose, and Ringstrom et al described a slight increase of mRNA apelin in isolated human pancreatic islets after glucose stimulation.^{14,15} In our study, although concentrations of glucose used ex vivo (30 mmol/L) are physiologically relevant and comparable to other studies,^{12,13} in vivo experiments required higher doses of glucose (up to 100 mg/100 μ L) to ensure that a significant amount of glucose reaches the small intestine a few minutes after oral load.

Apelin secretion in the lumen in response to sugar is in line with previous demonstration of luminal leptin secretion in the intestine after fructose load.¹³ The question arises of bioavailability of peptides in the lumen characterized by its acidic pH and proteolytic enzyme activity. Interestingly, orally administered apelin remains active, as shown by APJ activation and BRET studies. Leptin was shown to be secreted in the lumen together with a soluble receptor, allowing protection from degradation by proteolytic enzymes.²⁶ It could be hypothesized that such an associated protein could exist for apelin, and further consideration to propose pharmacologic modulations of luminal free/bound apelin concentrations is needed.

This glucose-induced luminal apelin secretion led us to investigate the functional effect of [Pyr-1]-apelin-13 on glucose absorption. We showed by different approaches that a physiological concentration of apelin enhances glucose transmural transport from lumen to the bloodstream. This effect is specific for glucose and not associated with modifications of the tight junction permeability of enterocytes because mannitol is not translocated from the lumen to the serosal side in the presence of apelin. Our results also show that, consistently with previous works in muscle and adipose tissue,^{9,27} apelin can also activate AMPK in enterocytes. AMPK is an important glucose sensor in enterocytes,^{13,28} and its activation must initiate the effects of apelin on glucose transporter balance. Indeed, apelin induced an ex vivo decrease of SGLT-1 in BBM, whereas GLUT2 expression was increased. SGLT-1 is a high-affinity low-capacity glucose carrier constitutively expressed in the BBM of epithelial cells lining the small intestine lumen. SGLT-1 is responsible for luminal glucose uptake against concentration gradient using a membrane potential generated by the sodium pump.²⁹ Conversely, when glucose concentration increases in the small intestine lumen, mechanisms including PKA, PKC β II, and AMPK α 2 activation are rapidly activated

Figure 6. In vivo effect of [Pyr-1]-apelin-13 on intestinal glucose absorption. (A) Apelin 200 pmol/kg (100 μ L, black bar) or PBS (100 μ L, white bar) was administrated to mice by gavage 10 minutes before oral glucose load (3 g/kg). Ten minutes after the glucose load, blood was collected from the hepatoportal vein for determination of glucose. Data are given as mean \pm SEM (n = 8) per group. ***P* < .01 versus PBS. (B) Glycemia after oral glucose load (3 g/kg) performed without (white bars) or with (black bars) APJ antagonist (1 μ mol/kg body wt, 200 μ L) given orally 10 minutes before glucose load. ***P* < .01 versus PBS. (C) GLUT2 and SGLT-1 mRNA expression in everted jejunal loops treated by [Pyr1]-apelin-13 (10⁻⁶ mol/L), APJ antagonist (5 \times 10⁻⁶ mol/L), and/or glucose (30 mmol/L) during 24 hours. Results are expressed as the mean \pm SEM of 5 mice. **P* < .05 vs Ct; ***P* < .01 vs Ct; #*P* < .05 vs glucose.



to traffic GLUT2 into the BBM.³⁰ The fact that [Pyr-1]-apelin-13 controls the activity of SGLT-1 and further triggers a switch in glucose transporters SGLT-1/GLUT2 ratio, activities, and gene expression gives new insight into control of physiological sugar absorption by apelin. It has been reported³¹ that GLUT2 is over-expressed in enterocytes during metabolic diseases, which could participate in postabsorptive elevated glycemia. Thus, as shown here, a pharmacologic approach consisting of the blockade of the glucose/apelin cycle by using an oral APJ antagonist could be used to lower glucose absorption.

In summary, the present data show the involvement of the apelinergic system in mechanisms controlling the in-

testinal absorption of glucose. As we recently described a putative role for apelin in glucose uptake in muscle and adipose tissue, it could be hypothesized that apelin first acts by enhancing intestinal glucose uptake from digested sugars to secondarily furnish energetic substrate to apelin-activated tissues. Consequently, intestinal apelin regulation by pharmacologic agents such as APJ antagonists could allow better control of blood sugar levels after a meal. This process could be compared with the effect of lipase inhibitors, which are clinically used to avoid lipid absorption. Finally, the present study brings a new paradigm on luminal secretion, bioavailability, and efficiency of gut peptides and paves the way for future utilization of apelin or apelin antagonists by the oral route.

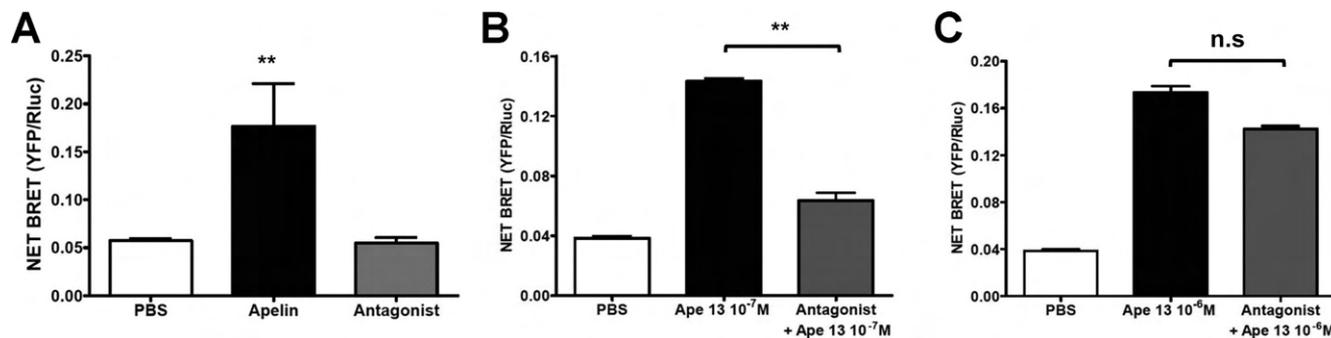


Figure 7. Orally administered [Pyr-1]-apelin-13 and APJ antagonist activity on APJ internalization. (A) Effect of luminal contents on net BRET signal in transfected cell. The content of the proximal intestine was collected 10 minutes after PBS, apelin, or APJ antagonist mouse gavage and filtered and purified by column (see Materials and Methods). n = 4–5 mice per group. ***P* < .01 versus PBS. (B and C) Effect of luminal content collected from mice staffed with PBS or APJ antagonist on exogenous synthetic [Pyr1]-apelin-13 (10⁻⁷ mol/L and 10⁻⁶ mol/L respectively) mediating β -arrestin 2 recruitment to APJ measured by BRET. n = 5 mice per group. ***P* < .01 vs [Pyr1]-apelin-13 alone.

Supplementary Material

Note: To access the supplementary material accompanying this article, visit the online version of *Gastroenterology* at www.gastrojournal.org, and at <http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2013.01.004>.

References

- O'Dowd BF, Heiber M, Chan A, et al. A human gene that shows identity with the gene encoding the angiotensin receptor is located on chromosome 11. *Gene* 1993;136:355–360.
- Tatemoto K, Hosoya M, Habata Y, et al. Isolation and characterization of a novel endogenous peptide ligand for the human APJ receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;251:471–476.
- Masri B, Knibiehler B, Audigier Y. Apelin signalling: a promising pathway from cloning to pharmacology. *Cell Signal* 2005;17:415–426.
- Carpene C, Dray C, Attane C, et al. Expanding role for the apelin/APJ system in physiopathology. *J Physiol Biochem* 2007;63:359–373.
- Castan-Laurell I, Dray C, Attane C, et al. Apelin, diabetes, and obesity. *Endocrine* 2011;40:1–9.
- Han S, Wang G, Qiu S, et al. Increased colonic apelin production in rodents with experimental colitis and in humans with IBD. *Regul Pept* 2007;142:131–137.
- Wang G, Anini Y, Wei W, et al. Apelin, a new enteric peptide: localization in the gastrointestinal tract, ontogeny, and stimulation of gastric cell proliferation and of cholecystokinin secretion. *Endocrinology* 2004;145:1342–1348.
- Castan-Laurell I, Dray C, Knauf C, et al. Apelin, a promising target for type 2 diabetes treatment? *Trends Endocrinol Metab* 2012;23:234–241.
- Dray C, Knauf C, Daviaud D, et al. Apelin stimulates glucose utilization in normal and obese insulin-resistant mice. *Cell Metab* 2008;8:437–445.
- Yue P, Jin H, Aillaud M, et al. Apelin is necessary for the maintenance of insulin sensitivity. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2010;298:E59–E67.
- Ducroc R, Guilmeau S, Akasbi K, et al. Luminal leptin induces rapid inhibition of active intestinal absorption of glucose mediated by sodium-glucose cotransporter 1. *Diabetes* 2005;54:348–354.
- Krimi RB, Letteron P, Chedid P, et al. Resistin-like molecule-beta inhibits SGLT-1 activity and enhances GLUT2-dependent jejunal glucose transport. *Diabetes* 2009;58:2032–2038.
- Sakar Y, Nazaret C, Letteron P, et al. Positive regulatory control loop between gut leptin and intestinal GLUT2/GLUT5 transporters links to hepatic metabolic functions in rodents. *PLoS One* 2009;4:e7935.
- Ringstrom C, Nitert MD, Bennet H, et al. Apelin is a novel islet peptide. *Regul Pept* 2010;162:44–51.
- Yamagata K, Tagawa C, Matsufuji H, et al. Dietary apigenin regulates high glucose and hypoxic reoxygenation-induced reductions in apelin expression in human endothelial cells. *J Nutr Biochem* 2012;23:929–936.
- Masri B, Salahpour A, Didriksen M, et al. Antagonism of dopamine D2 receptor/beta-arrestin 2 interaction is a common property of clinically effective antipsychotics. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:13656–13661.
- Macaluso NJ, Pitkin SL, Maguire JJ, et al. Discovery of a competitive apelin receptor (APJ) antagonist. *ChemMedChem* 2011;6:1017–1023.
- Mesmin C, Dubois M, Becher F, et al. Liquid chromatography/tandem mass spectrometry assay for the absolute quantification of the expected circulating apelin peptides in human plasma. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2010;24:2875–2884.
- Meddah B, Ducroc R, El Abbes Faouzi M, et al. *Nigella sativa* inhibits intestinal glucose absorption and improves glucose tolerance in rats. *J Ethnopharmacol* 2009;121:419–424.
- Kellett GL, Brot-Laroche E, Mace OJ, et al. Sugar absorption in the intestine: the role of GLUT2. *Annu Rev Nutr* 2008;28:35–54.
- Hirsh AJ, Cheeseman CI. Cholecystokinin decreases intestinal hexose absorption by a parallel reduction in SGLT1 abundance in the brush-border membrane. *J Biol Chem* 1998;273:14545–14549.
- Wong TP, Debnam ES, Leung PS. Involvement of an enterocyte renin-angiotensin system in the local control of SGLT1-dependent glucose uptake across the rat small intestinal brush border membrane. *J Physiol* 2007;584:613–623.
- Leturque A, Brot-Laroche E, Le Gall M. GLUT2 mutations, translocation, and receptor function in diet sugar managing. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2009;296:E985–E992.
- Cheeseman CI, Tsang R. The effect of GIP and glucagon-like peptides on intestinal basolateral membrane hexose transport. *Am J Physiol* 1996;271:G477–G482.
- Cammisotto PG, Gingras D, Bendayan M. Transcytosis of gastric leptin through the rat duodenal mucosa. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007;293:G773–G779.
- Guilmeau S, Buysse M, Tsocas A, et al. Duodenal leptin stimulates cholecystokinin secretion: evidence of a positive leptin-cholecystokinin feedback loop. *Diabetes* 2003;52:1664–1672.
- Attane C, Daviaud D, Dray C, et al. Apelin stimulates glucose uptake but not lipolysis in human adipose tissue *ex vivo*. *J Mol Endocrinol* 2011;46:21–28.
- Sakar Y, Meddah B, Faouzi MA, et al. Metformin-induced regulation of the intestinal D-glucose transporters. *J Physiol Pharmacol* 2010;61:301–307.
- Wright EM, Loo DD, Hirayama BA, et al. Surprising versatility of Na⁺-glucose cotransporters: SLC5. *Physiology (Bethesda)* 2004;19:370–376.
- Helliwell PA, Rumsby MG, Kellett GL. Intestinal sugar absorption is regulated by phosphorylation and turnover of protein kinase C beta1 mediated by phosphatidylinositol 3-kinase- and mammalian target of rapamycin-dependent pathways. *J Biol Chem* 2003;278:28644–28650.
- Ait-Omar A, Monteiro-Sepulveda M, Poitou C, et al. GLUT2 accumulation in enterocyte apical and intracellular membranes: a study in morbidly obese human subjects and ob/ob and high fat-fed mice. *Diabetes* 2011;60:2598–2607.

Received October 19, 2011. Accepted January 7, 2013.

Reprint requests

Address requests for reprints to: Cédric Dray, PhD, INSERM Unité 1048, Équipe no. 3, Institut des Maladies Métaboliques et Cardiovasculaires, I2MC, CHU Rangueil, Bâtiment L4, 1, Avenue Jean-Poulhès, BP 84225, 31432 Toulouse Cedex 4, France. e-mail: cedric.dray@inserm.fr; fax: (33) 0-5-61-32-56-22.

Acknowledgments

The authors thank Katia Marazova, Dr Remy Burcelin, and Dr Armelle Yart for helpful comments in preparing the manuscript and Aurelie Waget for technical assistance as well the animal facilities staff (Animalerie de Bichat et Service de Zootechnie UMS-006 Toulouse) and the Imaging I2MC staff (R. D'Angelo).

Conflicts of interest

The authors disclose no conflicts.

Fundings

This work was funded by INSERM, Université Paris Diderot Paris 7, and Université Paul Sabatier. Y.S. was a recipient of Fondation pour la Recherche Médicale.

ORIGINAL ARTICLE

Effect of endurance training on skeletal muscle myokine expression in obese men: identification of apelin as a novel myokine

A Besse-Patin^{1,2}, E Montastier^{1,2,3}, C Vinel^{2,4}, I Castan-Laurell^{2,4}, K Louche^{1,2}, C Dray^{2,4}, D Daviaud^{2,4}, L Mir^{1,2}, M-A Marques^{1,2}, C Thalamas^{1,2,5}, P Valet^{2,3}, D Langin^{1,2,3}, C Moro^{1,2,6} and N Viguerie^{1,2,6}

BACKGROUND: It has been suggested that the metabolic benefits of physical exercise could be mediated by myokines.

We examined here the effect of exercise training on skeletal muscle expression of a panel of myokines in humans. Pathways regulating myokine expression were investigated in human myotubes.

METHODS: Eleven obese non-diabetic male subjects were enrolled in an 8-week endurance training program. Insulin sensitivity was assessed by an oral glucose tolerance test. Subcutaneous adipose tissue and *Vastus lateralis* muscle biopsy samples were collected before and after training. RNAs were prepared from adipose tissue and skeletal muscle. Primary culture of myoblasts was established.

RESULTS: As expected, exercise training improved aerobic capacity and decreased fat mass. No significant change in interleukin 6, fibroblast growth factor 21, myostatin (MSTN) or irisin mRNA level was found in muscle after training. A twofold increase in apelin mRNA level was found in muscle but not in adipose tissue. No change in circulating myokine and adipokine plasma levels was observed in the resting state in response to training. Interestingly, apelin was significantly expressed and secreted in primary human myotubes. Apelin gene expression was upregulated by cyclic AMP and calcium, unlike the other myokines investigated. Importantly, changes in muscle apelin mRNA levels were positively related to whole-body insulin sensitivity improvement.

CONCLUSION: Collectively, our data show that exercise training upregulates muscle apelin expression in obese subjects. Apelin expression is induced by exercise signaling pathways and secreted *in vitro* in human primary myotubes, and may behave as a novel exercise-regulated myokine with autocrine/paracrine action.

International Journal of Obesity (2014) 38, 707–713; doi:10.1038/ijo.2013.158

Keywords: exercise; skeletal muscle cells; apelin; myokines

INTRODUCTION

Regular physical activity protects against numerous chronic diseases such as obesity, type 2 diabetes and cardiovascular diseases.¹ Some of the beneficial effects of regular exercise include lower blood pressure, improved glucose homeostasis and lipid profile, higher resting energy expenditure and reduced fat mass. Several mechanisms underlie such benefits. It is now widely accepted that regular exercise increases nutrient metabolism in various tissues by regulating the expression and activity of key metabolic control genes, leading to enhanced insulin sensitivity and metabolic flexibility.² The skeletal muscle exhibits remarkable metabolic adaptations to exercise, including mitochondrial biogenesis and improved substrate metabolism.^{3,4} How exactly the contracting muscle mediates the metabolic and physiological adaptations of exercise is still unclear.⁵ It has long been hypothesized that the muscle can produce endocrine signals capable of mediating the health benefits of exercise.⁶ As the skeletal muscle is the largest organ of the body, the discovery of

several factors secreted by the contracting muscle has led to a new field of research. These so-called myokines are secreted in response to exercise and can regulate in an autocrine and endocrine fashion the function of muscle and other organs.⁶ Skeletal muscle has been first considered as an endocrine organ because of its ability to produce interleukin 6 (IL6) as an exercise-released factor.⁷ IL6 induces lipolysis and improves insulin-stimulated glucose uptake.⁸ Another well-documented myokine is myostatin (MSTN). MSTN exhibits antihypertrophic effects in the skeletal muscle and MSTN null mice are characterized by an excessive muscle mass.⁹ Irisin originating from the proteolytic cleavage of fibronectin type III domain-containing protein 5 (FNDC5) and fibroblast growth factor 21 (FGF21) was recently identified as novel myokine.^{10,11} Irisin improves glucose homeostasis in mice, and seems to behave as a thermogenic factor involved in the browning of white subcutaneous adipose tissue in mice.¹⁰ FGF21 enhances whole-body insulin sensitivity and thermogenesis in brown adipose tissue.^{12,13} Although the

¹Inserm, UMR1048, Obesity Research Laboratory, I2MC, Institute of Metabolic and Cardiovascular Diseases, Toulouse, France; ²University of Toulouse, UMR1048, Paul Sabatier University, Toulouse, France; ³Nutrition and Clinical Biochemistry Departments, Toulouse University Hospitals, Toulouse, France; ⁴Inserm, UMR1048, Adipolab, I2MC, Institute of Metabolic and Cardiovascular Diseases, Toulouse, France and ⁵Clinical Investigation Centre Inserm, CIC-9302, Department of Clinical Pharmacology, Toulouse University Hospitals, Toulouse, France. Correspondence: Dr N Viguerie, Inserm, UMR1048, Obesity Research Laboratory, I2MC, Institute of Metabolic and Cardiovascular Diseases, CHU Rangueil, Av J Poulhès, Toulouse, 31432 Cedex 4, France.

E-mail: nathalie.viguerie@inserm.fr

⁶These authors contributed equally to this work.

Received 2 April 2013; revised 4 July 2013; accepted 20 July 2013; accepted article preview online 27 August 2013; advance online publication, 24 September 2013

effect of exercise training on the plasma levels of these myokines has been previously studied, inconsistent findings have been reported.^{14–18}

In the present study, we investigated skeletal muscle myokines (IL6, MSTN, Irisin, FGF21) gene expression and plasma levels in obese individuals in response to an 8-week aerobic exercise training intervention. To extend the knowledge on the adaptation of muscle to training, we performed a comprehensive gene expression profiling of human skeletal muscle. This led to the identification of apelin (APLN) as a novel factor upregulated by exercise training. Apelin expression, secretion and regulation by exercise-activated signaling pathways were next investigated *in vitro* in human primary myotubes.

SUBJECTS AND METHODS

Subjects

Eleven sedentary obese male volunteers who had stable weight during the previous 3 months were recruited at the Toulouse Clinical Investigation Centre (Table 1). The subjects were on their usual diet before the study and ate a weight-maintaining diet consisting of 35% fat, 16% protein and 49% carbohydrates 2 days before the experiment. None were previously enrolled in an endurance activity training. They were asked to maintain their dietary habits during the study and to refrain from vigorous physical activity 48 h before each clinical investigation day. Dietary intake was assessed by a dietician from a 3-day weighed food record, including 2 week days and 1 weekend day, the week before the first investigation day. Dietary records were assessed at baseline and during the last week of the program. Nutrient intake was calculated using PToFIL software v6.7 (Audit Conseil en Informatique Médicale, St Douillard, Bourges, France) with the CIQUAL French food composition database for diet composition.

Table 1. Changes in bio-clinical characteristics before and after 8 weeks of exercise training: (a) anthropometric and clinical parameters; (b) circulating adipokines and myokines

	Before training	After training	P-value
<i>(a)</i>			
BMI (kg m ⁻²)	32.6 ± 2.3	32.7 ± 2.5	0.722
Body weight (kg)	102.3 ± 6.5	102.6 ± 7.4	0.722
Fat free mass (kg)	62.1 ± 6.3	63.3 ± 7.4	0.075
Fat mass (kg)	36.3 ± 6.3	35.5 ± 6.8	0.033
Food intake (kcal/day)	2462 ± 774	2226 ± 519	0.183
Fasting insulin (mU l ⁻¹)	17.6 ± 7.9	13.7 ± 5.9	0.093
Fasting glucose (mm)	5.0 ± 0.5	4.9 ± 0.3	0.424
AUC glucose	167.8 ± 17.7	170.0 ± 20.7	0.214
AUC insulin	9208 ± 4633	11361 ± 5705	0.169
ISI-Matsuda	3.08 ± 1.51	3.63 ± 2.43	0.646
VO ₂ max/fat free mass (ml min ⁻¹ kg ⁻¹)	44.8 ± 3.8	47.9 ± 6.0	0.022
<i>(b)</i>			
Adiponectin (µg ml ⁻¹)	13.1 ± 3.7	12.4 ± 2.4	0.722
Leptin (ng ml ⁻¹)	37.6 ± 8.4	29.6 ± 7.1	0.077
RBP4 (µg ml ⁻¹)	43.9 ± 7.2	41.4 ± 7.1	0.155
IL6 (pg ml ⁻¹)	0.26 ± 0.07	0.24 ± 0.06	1.000
Apelin (pg ml ⁻¹)	514 ± 76	490 ± 89	0.328
FGF21 (pg ml ⁻¹)	123.1 ± 21.5	143.8 ± 33.0	0.354

Abbreviations: BMI, body mass index; ISI-Matsuda, insulin sensitivity Matsuda index. Data are mean ± s.d. (n = 11). P-value is extracted from Wilcoxon test.

Ethics statement

The study was performed according to the latest version of the Declaration of Helsinki and the Current International Conference on Harmonization (ICH) guidelines. It was approved by the Ethics Committee of Toulouse University Hospitals and all subjects gave written informed consent. The study is registered in Clinical Trials NCT01083329 and EudraCT 2009-012124-85.

Anthropometric and clinical parameters

Anthropometric parameters, blood samples, adipose tissue and skeletal muscle biopsy samples were analyzed during a 2-day investigation, 1 week apart, before and after the training program as follows. On day 1, after an overnight fast, maximal oxygen consumption (VO₂max) was measured on a braked bicycle ergometer as described in de Glisezinski *et al.*¹⁹ On day 2, after an overnight fast, blood samples were drawn and percutaneous biopsy samples of the *Vastus lateralis* muscle and of the abdominal subcutaneous adipose tissue were obtained as previously described.^{20,21} Ninety minutes after the end of biopsy sampling, an oral glucose tolerance test (OGTT) with 75 g glucose load was performed at 30-min intervals (times 30, 60, 90, 120). Body composition was assessed by dual-energy X-ray absorptiometry performed with a total body scanner (DPX, Software 3.6, Lunar Radiation Corp., Madison, WI, USA). Blood glucose was assayed using the glucose oxidase technique (Biomérieux, Paris, France). Plasma nonesterified fatty acids were assayed with an enzymatic method (Wako kit, Unipath, Dardilly, France). Serum insulin was measured by using a bi-insulin IRMA kit (Bertin Pharma, Montigny le Bretonneux, France). Plasma FGF21 and apelin were quantified with the Human FGF-21 Quantikine ELISA Kit (R&D Systems Europe, Lille, France) and the human EIA apelin-12 kit (Phoenix Pharmaceuticals, Belmont, CA, USA), respectively. Retinol binding protein 4 (RBP4) was analyzed by immuno-nephelometry on a BN ProSpec (Siemens HealthCare Diagnostics, Cergy-Pontoise, France). Other parameters were determined using standard clinical biochemistry methods. As it is a good reflection of the insulin sensitivity measured by an euglycemic insulin clamp, the Matsuda insulin sensitivity index (ISI-M) derived from oral glucose tolerance test is widely used in clinical and epidemiological research.²² ISI-M was calculated as: 10 000 per square root of [(fasting glucose × fasting insulin) × (mean glucose × mean insulin during oral glucose tolerance test)].

Exercise training program

The exercise training program was performed at the Centre de Ressources d'Expertise et de Performance Sportives (CREPS) of Toulouse. The 45–60-min exercise sessions consisted mainly of cycling and running, 5 times a week, for 8 weeks. Subjects exercised 3 times per week under supervision during the first 4 weeks and 2 times per week during the last 4 weeks. They exercised on their own during other sessions. All daily sessions consisted of at least a 20-min warm-up at 35% VO₂max followed by progressively increasing exercise intensity (up to 85% VO₂max) and duration (up to 1 h) throughout the training program. The subjects exercised at a target heart rate corresponding to 35–85% of their VO₂max. Heart rate was monitored with a Suunto T3 Cardiometer (MSE, Strasbourg, France). Compliance with training was good and the percentage of sessions completed was greater than 85% at the end of the study. Subjects were instructed to keep their usual dietary habits during the study. Adherence to the training program was self-reported. At the end of the 8-week training program they were investigated 48–72 h after the last exercise bout.

Indirect calorimetry

For determination of VO₂max, gas exchanges were measured as previously described.²³ Breath-by-breath measurements were taken at rest and throughout the exercise to assess air flow, and O₂ and CO₂ concentrations in expired gases using a computerized ergospirometer (Ultima PFX, Medical Graphics, St. Paul, MN, USA). Oxygen concentration was analyzed by a zirconium cell and CO₂ concentration by an infrared analyzer. Certified calibration gases were used to calibrate the analyzers every day before the beginning of the assay. The VO₂max exercise trial occurred in a ventilated room to ensure a constant room temperature and hygrometry from the calibration just before the trial.

DNA microarray and reverse transcription-quantitative PCR

Total RNA from frozen biopsies was prepared as previously described.^{20,24} Based on the concentration (Nanodro ND-1000 Spectrophotometer,

Labtech, Jebel Jeloud, Tunisia) and quality (Experion, Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) check, 9 subjects had enough high quality total RNA available for gene expression study. For reverse transcription-quantitative PCR, 500 ng of total RNA was used for first-strand cDNA synthesis using random hexamers and poly(dT) according to the Multiscribe reverse transcriptase kit (High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). TaqMan Assays (Applied Biosystems) were used with 18S RNA (Taqman Control Assays) for gene expression normalization. Microarray experiments were performed using Agilent 4 × 44k oligonucleotide arrays as described in Viguerie *et al.*²⁵ Hybridization quality check resulted in the analysis of microarray data from eight subjects. Microarray data have been deposited in NCBI's Gene Expression Omnibus and are accessible through GEO Series accession number GSE40551.

Cell culture

Satellite cells were isolated from fresh *V lateralis* biopsy samples obtained before training and cultured as previously described.²⁶ On day 4 of differentiation, the cells were treated as indicated with ionomycin, insulin, GW7647, GW0742 (Sigma-Aldrich, Courtaboeuf, France) or forskolin (Calbiochem Corp., Darmstadt, Germany). After 24 h, the medium was collected to measure secreted factors and cells were harvested for mRNA extraction. Samples were stored at -80 °C.

Statistical analyses

Gaussian distribution and homoscedasticity of data were tested with corrected Kolmogorov–Smirnov and Levene tests, respectively. Microarray data analyses were performed as described in Viguerie *et al.*²⁵ Mann–Whitney or Wilcoxon tests were used in non-parametric simple comparisons. Kruskal–Wallis and Dunn's post tests were performed in multiple comparisons and non-parametric data analyses. Spearman correlation analysis was used to assess the correlation between variables in non-parametric univariate analysis and *P*-values adjusted for multiple comparisons using the Benjamini–Hochberg procedure. To test for an independent association between insulin resistance and myokines, multiple linear regression models were computed using hierarchical regression in which changes (Δ) in fat mass were entered in a first block, Δ VO₂max, Δ plasma adipokines and myokines, and Δ myokine mRNA levels were introduced in the model using a stepwise procedure in a second block and Δ *APLN* mRNA level was introduced in the subsequent block. Statistical analyses were performed with GraphPad Prism software (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) and SPSS Statistics 17.0 software (SPSS, Chicago, IL, USA). Threshold for statistical significance was *P* < 0.05.

RESULTS

Anthropometric and clinical characteristics before and after endurance training

The 11 obese male volunteers were aged 35.4 ± 1.5 years. As expected, exercise training increased whole-body aerobic capacity (VO₂max) by about 7%, slightly reduced fat mass (mean fat mass loss 0.8 ± 0.4 kg) and tended to increase fat-free mass (mean fat-free mass gain 1.2 ± 0.6 kg) (Table 1a). Changes in body composition occurred despite no change in food intake. No significant changes in ISI-M and fasting plasma glucose were observed, whereas fasting plasma insulin tended to decrease in response to training (Table 1a).

Effect of endurance training on skeletal muscle myokine gene expression

We investigated the mRNA levels of *IL6*, *FGF21*, *MSTN* and *FND5* in the human skeletal muscle of obese individuals pre- and post-exercise intervention. Endurance training did not significantly change gene expression of the four candidate myokines (Figure 1).

Apelin mRNA level is increased in the skeletal muscle from obese individuals after endurance training

Analysis of the human skeletal muscle transcriptome before and after endurance training led to the identification of *APLN* as the most upregulated transcript encoding a known protein. *APLN* encodes apelin, a peptide that was so far known as an adipokine.²⁷ Reverse transcription-quantitative PCR confirmed a twofold increase in *APLN* after endurance training and displayed no change in its receptor *APJ* (Figure 2). A positive correlation between changes in muscle *APLN* mRNA levels and changes in ISI-M was found ($r = 0.81$, $P = 0.008$) in response to exercise training (Figure 3). A significant negative correlation with changes in fasting plasma insulin was also found ($r = -0.70$, $P = 0.036$). In a stepwise regression analysis, the best predictive model of change in ISI-M included changes in plasma RBP4 ($\beta = -0.723$), skeletal muscle *APLN* mRNA ($\beta = 0.241$) and fat mass ($\beta = -0.203$). This model explained 89% of the variability in ISI-M ($P = 0.008$).

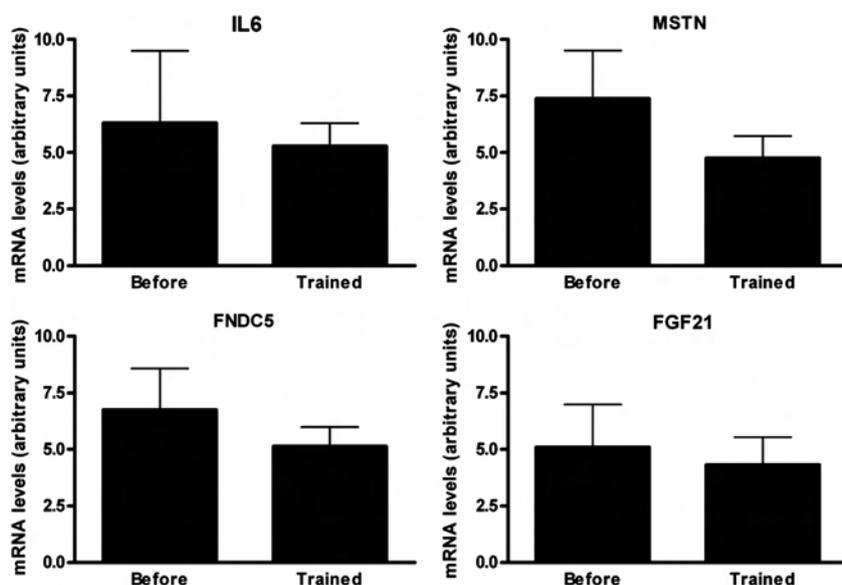


Figure 1. Effect of endurance training on myokine mRNA level in the human skeletal muscle. mRNA levels were measured before and after 8 weeks of endurance training using reverse transcription-quantitative PCR (RT-qPCR) normalized to 18S. Data are mean ± s.e.m. (*n* = 9).

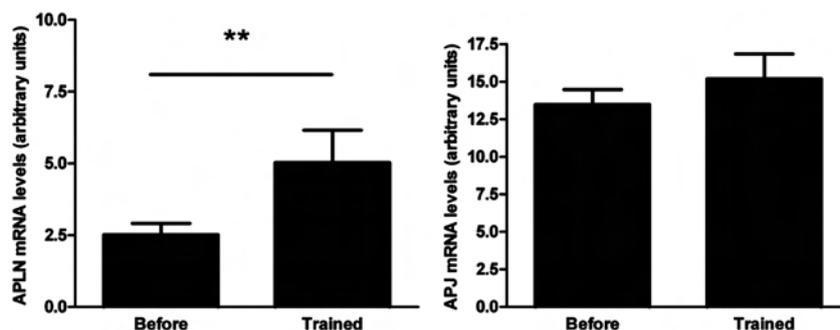


Figure 2. Effect of endurance training on apelin and APJ mRNA level in the human skeletal muscle. Apelin (APLN) and apelin receptor (APJ) mRNA levels were measured before and after 8 weeks of endurance training using RT-qPCR normalized to 18S. Data are mean \pm s.e.m. ($n = 9$). $**P < 0.01$ in a Wilcoxon test.

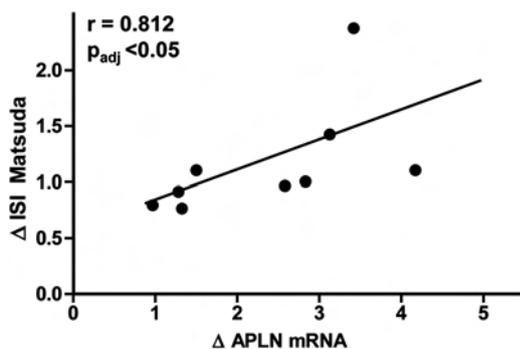


Figure 3. Correlation between changes in skeletal muscle apelin mRNA levels and insulin sensitivity index during endurance training. Spearman correlation between changes in skeletal muscle apelin (Δ APLN) mRNA levels and insulin sensitivity index (Δ ISI Matsuda) during an 8-week training of male volunteers ($n = 9$).

Regulation of myokine mRNA level and secretion in human primary myotubes

We next investigated the regulation of *APLN* and other candidate myokines *in vitro* in human primary myotubes established from *V lateralis* muscle. Myotubes were treated with drugs, mimicking the activation of exercise signaling pathways and enhancing calcium and cyclic adenosine monophosphate (cAMP) intracellular levels, ionomycin (a calcium ionophore) and forskolin (an adenylyl cyclase activator), respectively (Figure 4). Ionomycin treatment induced a 1.6-fold increase in *APLN* and 2-fold decrease in *FNDC5* expression. Ionomycin also slightly increased *MSTN* by 30% and decreased *IL6* by 30%. Forskolin treatment decreased *IL6*, *FGF21*, *FNDC5* and *MSTN* by 90%, 50%, 50% and 35%, respectively, whereas *APLN* increased by 3.3-fold. We also showed that activation of peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR) - α and - δ signaling as well as insulin treatment had no effect on *APLN* gene expression (Supplementary Figure 1). Of interest, FGF21 and apelin were detected in the culture medium at low levels when compared with plasma values (Figure 5 and Table 1B). Forskolin and ionomycin, respectively, decreased by 33% and increased by 2.4-fold the FGF21 concentration in the culture medium (Figure 5a). Apelin concentration in the culture medium was very low—about 50 times less than in plasma—and no significant change in apelin concentration was observed compared with control (Figure 5b).

Effect of endurance training on circulating levels of adipokines and myokines in obese individuals

In agreement with the observed fat mass loss, there was a trend for reduced plasma leptin concentrations, but no significant

change in adiponectin or RBP4 (Table 1B). Exercise training did not change significantly the resting plasma levels of IL6, FGF21 and apelin (Table 1B).

DISCUSSION

Endurance training is known to improve whole-body glucose homeostasis and to reduce the risk of developing type 2 diabetes.² In this study, we identify apelin as a novel myokine that might contribute to exercise training-mediated improvement of whole-body insulin sensitivity in obese individuals. Interestingly, skeletal muscle gene expression of other myokines with a role evoked in the regulation of insulin sensitivity remained unchanged in response to 8 weeks of exercise training in middle-aged obese men.

Accumulating data suggest that, during and following exercise, the skeletal muscle synthesizes and releases factors that may act either systemically or locally within the muscle tissue to mediate some of the metabolic and physiological adaptations of exercise.⁶ These secreted factors have been termed as myokines. Little is known on the regulation by acute and chronic exercise of the few myokines identified so far. In the present study, skeletal muscle whole-transcriptome profiling led us to identify *APLN* as a novel skeletal muscle transcript upregulated by exercise training. Apelin was so far known as an adipocyte-secreted peptide that modulates skeletal muscle glucose and lipid metabolism and increases insulin sensitivity via its receptor, APJ.²⁷ No changes in APJ mRNA levels were noted in the muscle in response to training. In addition, mRNA levels of other known myokines such as *IL6*, *FGF21*, *MSTN* and *FNDC5* remained unaffected by the training intervention in muscle (P -values > 0.1). Consistently, exercise training did not significantly change resting plasma concentrations of IL6 and FGF21. A decrease in *MSTN* in skeletal muscle appears to be a hallmark of exercise training. *MSTN* was previously found decreased in the muscle of old women after 12 weeks of aerobic training.²⁸ Here, despite non-significant change, a tendency to decrease appears for *MSTN*. *FNDC5* encodes a novel myokine, irisin, with thermogenic potential in white adipose tissue.²⁹ There has been a recent controversy on the regulation of skeletal muscle *FNDC5* by training in humans. In agreement with our data, unchanged expression of muscle *FNDC5* was recently reported in response to 6 weeks of endurance cycling.³⁰ In addition, a 12-week endurance exercise training induced no change in serum IL6 despite a twofold decrease in its skeletal muscle gene expression.³¹ Conversely, it was recently shown that a 2-week exercise program increased serum FGF21 in young healthy women.¹⁵ However, no report was made on skeletal muscle gene or protein expression. The contribution from each tissue to plasma level is unknown. In summary, part of the discrepancies between our study and other studies may be

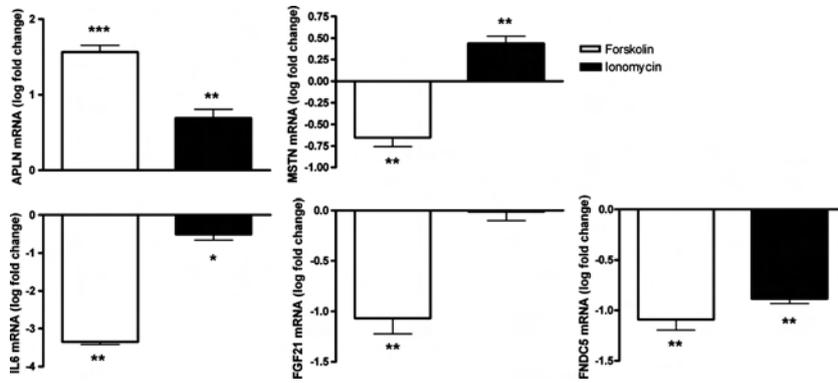


Figure 4. Effect of exercise mimetic signaling compounds on myokine mRNA level in human myotubes. Cells were treated with forskolin (4 μ M), ionomycin (0.5 μ M) or vehicle (control) for 24 h. Myokine mRNA level was measured using RT-qPCR normalized to 18S. Data are presented as base-2 log of mean fold change \pm s.e.m. relative to control cells ($n = 6-10$). *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$ and * $P < 0.05$ versus control cells in a one-way Kruskal–Wallis and Dunn's *post hoc* tests.

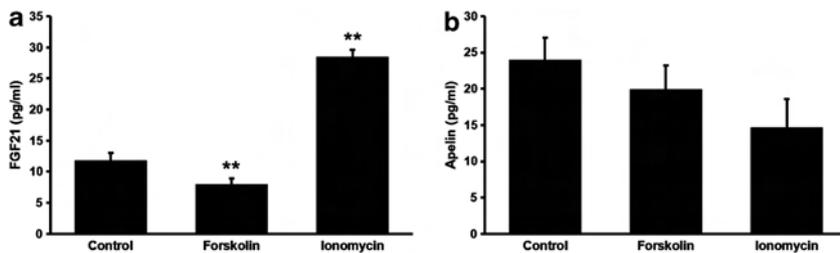


Figure 5. Effect of exercise mimetic signaling compounds on myokine concentrations in the culture medium of human myotubes. Cells were treated with forskolin (4 μ M), ionomycin (0.5 μ M) or vehicle (control) for 24 h. Culture media was tested for FGF21 (a) and apelin (b). Data are presented as mean \pm s.e.m. ($n = 6$). ** $P < 0.01$ versus control cells in a one-way Kruskal–Wallis and Dunn's *post hoc* tests.

explained by the age of the subjects, their obesity status and possibly the difference in exercise training volume and duration.

Despite non-significant change in food intake, the 8-week training program induced a slight but significant fat-mass loss, indicating that a slight energy deficit was achieved with exercise training. As apelin was primarily described as an adipokine, a decrease in circulating apelin was expected, as recently described.³² In type 2 diabetic individuals, 12–24-month aerobic training programs increased plasma apelin while fat mass was unaffected.^{33,34} Here, the absence of changes in plasma apelin level may be the result of compensation due to both, the increase in muscle mass and the enhanced gene expression of skeletal muscle *APLN*, while no change in *APLN* expression was found in adipose tissue (data not shown). Also, mice overexpressing apelin had no increase in plasma apelin content, whereas enhanced metabolic function was seen in skeletal muscle.³⁵ Alternatively, the upregulation of muscle *APLN* expression in the face of no apparent changes in plasma apelin levels may suggest that apelin is produced to act locally on skeletal muscle fibers in a similar fashion to interleukin 8.³⁶ In addition, a positive correlation between change in skeletal muscle *APLN* and increase in ISI-M was observed. Besides a change in plasma RBP4 level, the increase in skeletal muscle *APLN* appeared as a weak independent contributor of insulin sensitivity during exercise training. This is in agreement with at least another study.³⁴ RBP4 is an adipokine with a controversial role in insulin resistance,³⁷ whereas apelin has been previously shown to promote glucose uptake in skeletal muscle.³⁸ Collectively, our data indicate that skeletal muscle apelin might have a role in the exercise training-induced improvement of insulin sensitivity through autocrine/paracrine effects within the skeletal muscle.

To confirm that apelin is a novel myokine, we next investigated its expression, secretion and regulation *in vitro* in human primary myotubes, besides other known myokines (IL6, MSTN, FGF21 and

FNDC5). Thus, little is known on the regulation of myokines expression *in vitro*. Exercise induces muscle contraction through a rise in intracellular cyclic adenosine monophosphate and calcium along with other pathways.⁵ It was previously shown that activation of cyclic adenosine monophosphate/protein kinase A and calcium signaling pathways in human primary myotubes induces PGC-1 α and peroxisome proliferator-activated receptors - δ gene expression, and promotes mitochondrial biogenesis.³⁹ These pathways also favor lipid oxidation and glycogen storage. In this study, activation of cyclic adenosine monophosphate signaling by forskolin consistently downregulated *IL6*, *MSTN*, *FGF21* and *FNDC5* expression *in vitro*, while it strongly induced *APLN*. In the same line, activation of calcium signaling by ionomycin significantly induced *APLN* expression while downregulating *IL6* and *FNDC5*. As previous studies have shown that both exercise and muscle contraction induce *IL6* mRNA,⁴⁰ this suggests that the transcriptional regulation of myokines is complex and involves multiple synergistic pathways. Interestingly, we could show that both apelin and FGF21 are secreted in the culture medium of human primary myotubes. Of note, FGF21 secretion paralleled its gene transcription pattern in response to forskolin treatment. In contrast, apelin concentration in the culture medium was very low, about 50 times less than in plasma, and apelin secretion remained unchanged in response to both forskolin and ionomycin treatments. This suggests that apelin may be secreted by skeletal muscle cells, but because of its very short half-life (<5 min)⁴¹ the peptide may be quickly degraded, thus preventing a significant accumulation in the medium overtime. A possible interaction of apelin with circulating proteins³⁵ and instability in human plasma⁴² was also reported. Additionally, skeletal muscle may not contribute significantly to circulating concentrations of plasma apelin. Furthermore, as various apelin isoforms exist in plasma,⁴² the possibility of a

specific skeletal muscle isoform cannot be excluded. It can be hypothesized that apelin is acutely released by skeletal muscle during exercise to act locally on its own receptor as an autocrine/paracrine regulator. In humans, *APLN* and *APJ* mRNA levels are known to be regulated by insulin in adipocytes.²⁷ We found here no direct effect of insulin, PPAR- α and/or PPAR- δ agonists on *APLN* expression in human myotubes (Supplementary Figure 1). These data also indicate a differential regulation of *APLN* expression between fat and muscle cells. The upregulation of apelin expression in skeletal muscle is in agreement with apelin transgenic and knockout mice data demonstrating a positive role of apelin in skeletal muscle vascular mass and mitochondrial biogenesis,³⁵ and in the maintenance of insulin sensitivity.⁴³ Considering the potential role of apelin in the regulation of lipid metabolism and insulin sensitivity,²⁷ future studies should investigate the functional and metabolic role of apelin in the human skeletal muscle.

In summary, these data highlight apelin as a novel exercise-regulated myokine in humans. Apelin is expressed, secreted and responsive to exercise-activated signaling pathways in cultured human primary myotubes. Skeletal muscle *APLN* expression is upregulated by 8 weeks of endurance exercise training in obese male subjects and might contribute to exercise training-mediated improvement of whole-body insulin sensitivity. Collectively, these data suggest that apelin may be locally produced by skeletal muscle fibers in response to exercise and acts locally to improve muscle metabolism and function. Future studies should investigate the influence of acute exercise on skeletal muscle apelin expression, as well as its metabolic role in the human skeletal muscle.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are very grateful to the staff of Toulouse Clinical Investigation Centre and to the study participants. This study was supported by grants from the National Research Agency ANR-12-JSV1-0010-01 (CM) and ANR-09-GENO-0018-01 (DL), European Federation for the Study of Diabetes/Novo Nordisk and Société Francophone du Diabète (CM), Inserm DHOS Recherche Translationnelle and AOL Hôpitaux de Toulouse (DL), Fondation pour la Recherche Médicale (DL), Inserm DHOS Recherche Translationnelle 2009 (CT, DL), AOL 08 163 02 Hôpitaux de Toulouse (CT, DL) and Glaxo Smith Kline (DL).

REFERENCES

- Blair SN, Church TS. The fitness, obesity, and health equation: is physical activity the common denominator? *JAMA* 2004; **292**: 1232–1234.
- Egan B, Zierath JR. Exercise metabolism and the molecular regulation of skeletal muscle adaptation. *Cell Metab* 2013; **17**: 162–184.
- Holloszy JO. Regulation by exercise of skeletal muscle content of mitochondria and GLUT4. *J Physiol Pharmacol* 2008; **59**(Suppl 7): 5–18.
- Hood DA. Mechanisms of exercise-induced mitochondrial biogenesis in skeletal muscle. *Appl Physiol Nutr Metab* 2009; **34**: 465–472.
- Rockl KS, Witczak CA, Goodyear LJ. Signaling mechanisms in skeletal muscle: acute responses and chronic adaptations to exercise. *IUBMB Life* 2008; **60**: 145–153.
- Pedersen BK, Febbraio MA. Muscles, exercise and obesity: skeletal muscle as a secretory organ. *Nat Rev Endocrinol* 2012; **8**: 457–465.
- Febbraio MA. Signaling pathways for IL-6 within skeletal muscle. *Exerc Immunol Rev* 2003; **9**: 34–39.
- Carey AL, Steinberg GR, Macaulay SL, Thomas WG, Holmes AG, Ramm G et al. Interleukin-6 increases insulin-stimulated glucose disposal in humans and glucose uptake and fatty acid oxidation *in vitro* via AMP-activated protein kinase. *Diabetes* 2006; **55**: 2688–2697.
- McPherron AC, Lawler AM, Lee SJ. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member. *Nature* 1997; **387**: 83–90.
- Bostrom P, Wu J, Jedrychowski MP, Korde A, Ye L, Lo JC et al. A PGC1-alpha-dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and thermogenesis. *Nature* 2012; **481**: 463–468.
- Izumiya Y, Bina HA, Ouchi N, Akasaki Y, Kharitononkov A, Walsh K. FGF21 is an Akt-regulated myokine. *FEBS Lett* 2008; **582**: 3805–3810.
- Hondares E, Rosell M, Gonzalez FJ, Giral M, Iglesias R, Villarrojo F. Hepatic FGF21 expression is induced at birth via PPARalpha in response to milk intake and contributes to thermogenic activation of neonatal brown fat. *Cell Metab* 2010; **11**: 206–212.
- Kharitononkov A, Shiyanova TL, Koester A, Ford AM, Micanovic R, Galbreath EJ et al. FGF-21 as a novel metabolic regulator. *J Clin Invest* 2005; **115**: 1627–1635.
- Chavez AO, Molina-Carrion M, Abdul-Ghani MA, Folli F, Defronzo RA, Tripathy D. Circulating fibroblast growth factor-21 is elevated in impaired glucose tolerance and type 2 diabetes and correlates with muscle and hepatic insulin resistance. *Diabetes Care* 2009; **32**: 1542–1546.
- Cuevas-Ramos D, Almeda-Valdes P, Meza-Arana CE, Brito-Cordova G, Gomez-Perez FJ, Mehta R et al. Exercise increases serum fibroblast growth factor 21 (FGF21) levels. *PLoS One* 2012; **7**: e38022.
- Hittel DS, Axelson M, Sarna N, Shearer J, Huffman KM, Kraus WE. Myostatin decreases with aerobic exercise and associates with insulin resistance. *Med Sci Sports Exerc* 2010; **42**: 2023–2029.
- Huh JY, Panagiotou G, Mougios V, Brinkoetter M, Vamvini MT, Schneider BE et al. FNDC5 and irisin in humans: I. Predictors of circulating concentrations in serum and plasma and II. mRNA expression and circulating concentrations in response to weight loss and exercise. *Metabolism* 2012; **61**: 1725–1738.
- Yang SJ, Hong HC, Choi HY, Yoo HJ, Cho GJ, Hwang TG et al. Effects of a three-month combined exercise programme on fibroblast growth factor 21 and fetuin-A levels and arterial stiffness in obese women. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2011; **75**: 464–469.
- de Glisezinski I, Moro C, Pillard F, Marion-Latard F, Harant I, Meste M et al. Aerobic training improves exercise-induced lipolysis in SCAT and lipid utilization in overweight men. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2003; **285**: E984–E990.
- Marquez-Quinones A, Mutch DM, Debarde C, Wang P, Combes M, Roussel B et al. Adipose tissue transcriptome reflects variations between subjects with continued weight loss and subjects regaining weight 6 mo after caloric restriction independent of energy intake. *Am J Clin Nutr* 2010; **92**: 975–984.
- Moro C, Galgani JE, Luu L, Pasarica M, Mairal A, Bajpeyi S et al. Influence of gender, obesity, and muscle lipase activity on intramyocellular lipids in sedentary individuals. *J Clin Endocrinol Metab* 2009; **94**: 3440–3447.
- Taniguchi A, Fukushima M, Nagasaka S, Matsumoto K, Tokuyama K, Doi K et al. Insulin sensitivity indexes from a single sample in nonobese Japanese type 2 diabetic patients: comparison with minimal model analysis. *Diabetes Care* 2002; **25**: 626–640.
- Pillard F, Van Wymelbeke V, Garrigue E, Moro C, Crampes F, Guillaud JC et al. Lipid oxidation in overweight men after exercise and food intake. *Metabolism* 2010; **59**: 267–274.
- Larrouy D, Barbe P, Valle C, Dejean S, Pelloux V, Thalamas C et al. Gene expression profiling of human skeletal muscle in response to stabilized weight loss. *Am J Clin Nutr* 2008; **88**: 125–132.
- Viguerie N, Picard F, Hul G, Roussel B, Barbe P, Iacovoni JS et al. Multiple effects of a short-term dexamethasone treatment in human skeletal muscle and adipose tissue. *Physiol Genomics* 2012; **44**: 141–151.
- Badin PM, Louche K, Mairal A, Liebisch G, Schmitz G, Rustan AC et al. Altered skeletal muscle lipase expression and activity contribute to insulin resistance in humans. *Diabetes* 2011; **60**: 1734–1742.
- Castan-Laurell I, Dray C, Knauf C, Kunduzova O, Valet P. Apelin, a promising target for type 2 diabetes treatment? *Trends Endocrinol Metab* 2012; **23**: 234–241.
- Konopka AR, Douglass MD, Kaminsky LA, Jemiolo B, Trappe TA, Trappe S et al. Molecular adaptations to aerobic exercise training in skeletal muscle of older women. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2010; **65**: 1201–1207.
- Moreno-Navarrete JM, Ortega F, Serrano M, Guerra E, Pardo G, Tinahones F et al. Irisin is expressed and produced by human muscle and adipose tissue in association with obesity and insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab* 2013; **98**: E769–E778.
- Timmons JA, Baar K, Davidsen PK, Atherton PJ. Is irisin a human exercise gene? *Nature* 2012; **488**: E9–E10, discussion E10–11.
- Lambert CP, Wright NR, Finck BN, Villareal DT. Exercise but not diet-induced weight loss decreases skeletal muscle inflammatory gene expression in frail obese elderly persons. *J Appl Physiol* 2008; **105**: 473–478.
- Krist J, Wiedler K, Kloting N, Oberbach A, Kralisch S, Wiesner T et al. Effects of weight loss and exercise on apelin serum concentrations and adipose tissue expression in human obesity. *Obes Facts* 2013; **6**: 57–69.
- Kadoglou NP, Fotiadis G, Kapelouzou A, Kostakis A, Liapis CD, Vrabas IS. The differential anti-inflammatory effects of exercise modalities and their

- association with early carotid atherosclerosis progression in patients with Type 2 diabetes. *Diabet Med* 2013; **30**: e41–e50.
- 34 Kadoglou NP, Vrabas IS, Kapelouzou A, Lampropoulos S, Sailer N, Kostakis A *et al*. The impact of aerobic exercise training on novel adipokines, apelin and ghrelin, in patients with type 2 diabetes. *Med Sci Monit* 2012; **18**: CR290–CR295.
- 35 Yamamoto T, Habata Y, Matsumoto Y, Yasuhara Y, Hashimoto T, Hamajyo H *et al*. Apelin-transgenic mice exhibit a resistance against diet-induced obesity by increasing vascular mass and mitochondrial biogenesis in skeletal muscle. *Biochim Biophys Acta* 2011; **1810**: 853–862.
- 36 Akerstrom T, Steensberg A, Keller P, Keller C, Penkowa M, Pedersen BK. Exercise induces interleukin-8 expression in human skeletal muscle. *J Physiol* 2005; **563**: 507–516.
- 37 Kotnik P, Fischer-Posovszky P, Wabitsch M. *Eur J Endocrinol* 2011; **165**: 703–711.
- 38 Dray C, Knauf C, Daviaud D, Waget A, Boucher J, Buleon M *et al*. Apelin stimulates glucose utilization in normal and obese insulin-resistant mice. *Cell Metab* 2008; **8**: 437–445.
- 39 Sparks LM, Moro C, Ukropcova B, Bajpeyi S, Civitarese AE, Hulver MW *et al*. Remodeling lipid metabolism and improving insulin responsiveness in human primary myotubes. *PLoS One* 2011; **6**: e21068.
- 40 Buford TW, Cooke MB, Willoughby DS. Resistance exercise-induced changes of inflammatory gene expression within human skeletal muscle. *Eur J Appl Physiol* 2009; **107**: 463–471.
- 41 Barnes G, Japp AG, Newby DE. Translational promise of the apelin-APJ system. *Heart* 2010; **96**: 1011–1016.
- 42 Mesmin C, Dubois M, Becher F, Fenaille F, Ezan E. Liquid chromatography/tandem mass spectrometry assay for the absolute quantification of the expected circulating apelin peptides in human plasma. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2010; **24**: 2875–2884.
- 43 Yue P, Jin H, Aillaud M, Deng AC, Azuma J, Asagami T *et al*. Apelin is necessary for the maintenance of insulin sensitivity. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2010; **298**: E59–E67.

Supplementary Information accompanies this paper on International Journal of Obesity website (<http://www.nature.com/ijo>)

Lysophosphatidic acid impairs glucose homeostasis and inhibits insulin secretion in high-fat diet obese mice

C. Rancoule · C. Attané · S. Grès · A. Fournel ·
R. Dusauley · C. Bertrand · C. Vinel · K. Tréguer ·
M. Prentki · P. Valet · J. S. Saulnier-Blache

Received: 3 October 2012 / Accepted: 4 March 2013 / Published online: 19 March 2013
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2013

Abstract

Aims/hypothesis Lysophosphatidic acid (LPA) is a lipid mediator produced by adipocytes that acts via specific G-protein-coupled receptors; its synthesis is modulated in obesity. We previously reported that reducing adipocyte LPA production in high-fat diet (HFD)-fed obese mice is associated with improved glucose tolerance, suggesting a negative impact of LPA on glucose homeostasis. Here, our aim was to test this hypothesis.

Methods First, glucose tolerance and plasma insulin were assessed after acute (30 min) injection of LPA (50 mg/kg) or of the LPA1/LPA3 receptor antagonist Ki16425 (5 mg kg⁻¹ day⁻¹, i.p.) in non-obese mice fed a normal diet (ND) and in obese/prediabetic (defined as glucose-intolerant) HFD mice. Glucose and insulin tolerance, pancreas morphology,

glycogen storage, glucose oxidation and glucose transport were then studied after chronic treatment (3 weeks) of HFD mice with Ki16425.

Results In ND and HFD mice, LPA acutely impaired glucose tolerance by inhibiting glucose-induced insulin secretion. These effects were blocked by pre-injection of Ki16425 (5 mg/kg, i.p.). Inhibition of glucose-induced insulin secretion by LPA also occurred in isolated mouse islets. Plasma LPA was higher in HFD mice than in ND mice and Ki16425 transiently improved glucose tolerance. The beneficial effect of Ki16425 became permanent after chronic treatment and was associated with increased pancreatic islet mass and higher fasting insulinaemia. Chronic treatment with Ki16425 also improved insulin tolerance and increased liver glycogen storage and basal glucose use in skeletal muscle.

Conclusions/interpretation Exogenous and endogenous LPA exerts a deleterious effect on glucose disposal through a reduction of plasma insulin; pharmacological blockade of LPA receptors improves glucose homeostasis in obese/prediabetic mice.

Keywords Antagonist · Glucose homeostasis · Insulin · Lysophosphatidic acid · Obesity · Receptors

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00125-013-2891-3) contains peer-reviewed but unedited supplementary material, which is available to authorised users.

C. Rancoule · S. Grès · A. Fournel · R. Dusauley · C. Bertrand ·
C. Vinel · K. Tréguer · P. Valet · J. S. Saulnier-Blache (✉)
Institut des Maladies Métaboliques et Cardiovasculaires (I2MC),
Université Paul Sabaties, Inserm U1048, 1 avenue Jean Poulhès,
BP 84225, 31432 Toulouse Cedex 4, France
e-mail: Jean-Sebastien.Saulnier-Blache@inserm.fr

C. Attané · M. Prentki
Molecular Nutrition Unit and Montreal Diabetes Research Center
at the Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université
de Montréal (CHUM), Montréal, QC, Canada

M. Prentki
Department of Nutrition, Université de Montréal,
Montréal, QC, Canada

M. Prentki
Department of Biochemistry, Université de Montréal,
Montréal, QC, Canada

Abbreviations

ATX	Autotaxin
FATX-KO	Adipocyte-specific ATX knockout
HFD	High-fat diet
KH	Krebs–Henseleit
KRBH	Krebs Ringer Bicarbonate HEPES buffer
LPA	Lysophosphatidic acid
MCP	Monocyte chemotactic protein
ND	Normal diet

Introduction

Excessive accumulation of adipose tissue in obesity is frequently associated with metabolic defects (postprandial hyperglycaemia, dyslipidaemia, insulin resistance) that may lead to type 2 diabetes and cardiovascular diseases (hypertension, atherosclerosis, nephropathies) [1, 2]. In parallel with its lipid storage capacity, the adipose tissue produces various bioactive molecules (adipokines, reactive phospholipids, glycerol, NEFA). The export of these molecules from adipose tissue is often altered in obese individuals and some of them (TNF- α , resistin, monocyte chemoattractant protein-1 [MCP-1]) exert deleterious effects on glucose metabolism and insulin sensitivity [3].

Lysophosphatidic acid (LPA) is a phospholipid mediator that regulates several cellular responses (proliferation, migration, differentiation) via specific G-protein-coupled receptors (LPA1R to LPA6R) [4]. LPA is synthesised via the hydrolysis of lysophosphatidylcholine by a secreted lysophospholipase D (autotaxin [ATX]) [5, 6]. The available pharmacological tools targeting ATX/LPA signalling are still scarce [7–9]. Ki16425 [10] is a mixed LPA receptor antagonist that exhibits close and preferential affinity for the LPA1R and LPA3R subtypes (250 and 360 nmol/l, respectively) [8, 10] and its *in vivo* antagonist efficiency has been documented [11–13].

White adipose tissue secretes ATX and LPA in the extracellular milieu [12, 14–16]. The expression of ATX is increased in the adipose tissue of obese insulin-resistant individuals and mice [16–18]. Plasma levels of LPA are increased in high-fat diet (HFD) obese mice as the result of an increased expression of ATX in adipocytes [19]. Invalidation of ATX in adipocytes (FATX-KO mice) reduces plasma LPA and enhances fat mass in HFD-fed mice [19], in agreement with the anti-adipogenic effect of LPA [20].

Whereas the growth factor-like properties of LPA have been studied extensively, a few and primarily *in vitro* studies have reported that LPA also regulates glucose metabolism [21–23]. Interestingly, *in vivo* deletion of ATX in adipocytes (FATX-KO mice) is associated with a better glucose tolerance [19], suggesting a negative effect of LPA on glucose homeostasis. If this hypothesis is correct, LPA receptors could represent valuable pharmacological targets for the treatment of impaired glucose homeostasis associated with obesity.

Our objective was to study the influence of LPA on glucose and insulin homeostasis. We found that administration of LPA to mice impairs glucose disposal via a reduction of plasma insulin levels, and that chronic pharmacological blockade of the LPA receptors restores normal glucose homeostasis in HFD obese/prediabetic (defined as glucose intolerant) mice.

Methods

Mice C57Bl6/J male mice were housed conventionally under a constant temperature (20–22°C) and humidity (50–60%) with a 12/12 h light/dark cycle (lights on at 07:00 hours) and free access to food and water. Mice were handled in accordance with the principles and guidelines established by the National Institute of Medical Research (Inserm) and in conformity with the ‘Principles of laboratory animal care’ (NIH publication no. 85–23, revised 1985 <http://grants1.nih.gov/grants/olaw/references/phspol.htm>). The local animal facility committee at Inserm approved our protocols.

Diet The mice were first fed a normal diet (ND; energy content 16% protein, 81% carbohydrate and 3% fat [SAFE, Augy, France]) until the age of 10 weeks. Mice were then fed either an ND or an HFD (energy content 20% protein, 35% carbohydrate and 45% fat [Research Diets-Brogaarden (Lyngø, Denmark)]) for 9 weeks. At that step, HFD mice were considered obese and prediabetic. They had a higher body weight (35.6 ± 1.0 vs 29.9 ± 0.6 g; $p < 0.01$) and a higher body-fat mass (24.6 ± 2.0 vs 5.6 ± 1.1 % of total body weight; $p < 0.001$) when compared with ND mice. Moreover, HFD mice displayed a deterioration in glucose tolerance (35% increase in AUC when compared with ND mice) (Control, Fig. 1d, e vs i, j) associated with a slight increase in fasting glycaemia (Control, Fig. 1b vs g) but no change in fasting insulinaemia (Control, Fig. 1c vs h).

Treatment Ki16425 Cayman Chemicals-Interchim (Montluçon, France) was diluted at a concentration of 1 mg/ml in PBS supplemented with 10% DMSO. LPA (oleoyl lysophosphatidic acid; Avanti Polar, Alabaster, AL, USA) was diluted at 15 mg/ml in PBS supplemented with 1% fatty-acid-free BSA. Ki16425 (5 mg/kg), LPA (50 mg/kg) and vehicle (control) were administered by *i.p.* injection. Treatments with Ki16425 and LPA started 9 weeks after beginning the feeding protocol. The dose of LPA injected was adapted from previous reports [24, 25]. The concentration of Ki16425 used had previously been demonstrated to block LPA receptors *in vivo* [26]. Acute treatments consisted of injecting a single dose of LPA or Ki16425 30 min before conducting glucose or insulin tolerance tests. Acute treatments were performed on ND and HFD mice after 9 weeks of diet. Chronic treatment consisted of a daily injection of Ki16425 for 3 weeks. HFD was maintained during chronic treatment. Chronic treatment was followed by glucose or insulin tolerance tests, which were conducted 24 h after the last injection of Ki16425. After glucose or insulin tolerance tests, treatment with Ki16425 was continued for few days before the mice were killed after an overnight fasting. Plasma and organs were collected for further analysis.

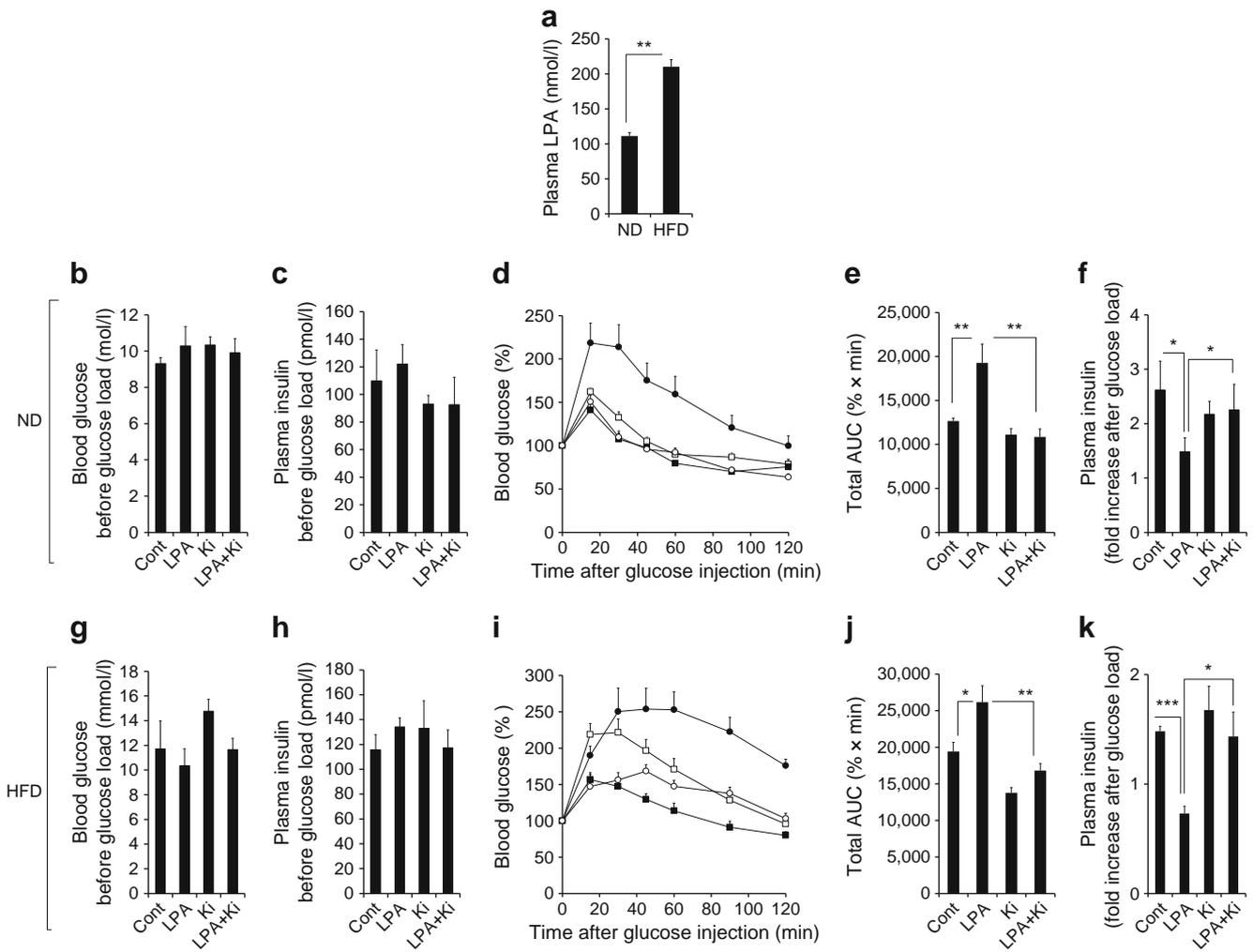


Fig. 1 Acute regulation of glucose tolerance by LPA and Ki16425 in ND and HFD mice. **(a)** Plasma LPA concentration in ND and HFD mice after 9 weeks of diet. **(b–k)** 7 h fasted ND **(b–f)** and HFD **(g–k)** mice received a single injection of LPA or vehicle (Cont) with or without a pre-injection of Ki16425 (Ki) administered 10 min before the LPA or vehicle. White squares, vehicle; black circles, LPA; black squares, Ki16425; white circles, LPA + Ki16425. After 30 min a

glucose tolerance test was conducted. Blood glucose **(b, g)** and plasma insulin **(c, h)** concentrations measured before glucose load. **(d, i)** Blood glucose concentration during the glucose tolerance test, expressed as per cent of concentration at time 0, and corresponding AUC **(e, j)**. **(f, k)** Fold change in plasma insulin from 15 min before to 15 min after glucose load. Values are means \pm SEM of four to six mice per group. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$, comparing indicated values

Glucose and insulin tolerance tests Mice were fasted for 7 h before i.p. injection of glucose (1 g/kg) or insulin (0.75 U/kg). Blood from the tail vein was sampled before glucose load and every 15 min over 120 min to monitor glucose concentration. Plasma was collected 15 min before and after glucose injection to quantify insulin concentration. Glucose and insulin tolerance tests were conducted on separate groups of mice to limit the stress on the mice.

Body-fat-mass composition Fat and lean masses were determined by placing mice in a clear plastic holder, without anaesthesia or sedation, and inserting into the EchoMRI-3-in-1 system (Echo Medical Systems, Houston, TX, USA). The measure was performed 1 day before acute treatments

with LPA and Ki16425, and after chronic treatment with Ki16425.

Blood analysis Blood glucose was quantified using a glucose meter (Accu-Chek; Roche Diagnostic, Grenoble, France). Plasma insulin was quantified using a mouse insulin ELISA kit (Merckodia, Uppsala, Sweden). Plasma NEFA were measured using the enzymatic colorimetric Wako NEFA kit (Wako Chemicals, Neuss, Germany). Plasma triacylglycerols were measured using the enzymatic colorimetric PAP 150 Kit (BioMerieux, Marcy l'Etoile, France). Plasma leptin and adiponectin were determined using Quantkine Immunoassays (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). Plasma LPA was measured using a radioenzymatic assay as previously

described [19, 27]. Briefly, lipids were extracted from conditioned media or plasma with an equal volume of 1-butanol and evaporated. Extracted lipids were converted into [^{14}C]phosphatidic acid with recombinant LPA acyl-transferase in the presence of [^{14}C]oleoyl-CoA. The products of the reaction were extracted, separated by one-dimensional thin-layer chromatography and autoradiographed.

Organ triacylglycerol content Skeletal muscle and liver were homogenised and triacylglycerols were extracted from 500 μl homogenate using 2.5 ml chloroform/methanol (2:1 vol./vol.) and 1.2 ml KCl/HCl 2 mol/l was added. The organic phase was evaporated and solubilised in isopropyl alcohol, and triacylglycerols were quantified using an enzymatic colorimetric PAP 150 Kit (BioMerieux).

Organ glycogen content Skeletal muscle or liver was digested in NaOH (1 mol/l) and digestion was stopped with HCl (1 mol/l). Digestate was diluted in sodium acetate (1:4 vol./vol.) unsupplemented or supplemented with amyloglucosidase (500 U/ml) (Sigma-Aldrich, St Quentin Fallavier, France) and incubated at 55°C for 1 h to transform glycogen into glucose. Released glucose was quantified using an RTU kit (BioMerieux).

Glucose oxidation in ex vivo muscle Glucose oxidation was measured as previously described [28] with minor modifications. Red bundles from gastrocnemius muscle were incubated in modified Krebs–Henseleit (KH) buffer containing 0.2% fatty-acid-free BSA, 5 mmol/l glucose and 5,550 Bq/ml [^{14}C] glucose (PerkinElmer, Woodbridge, ON, Canada) for 60 min at 37°C in a sealed glass vial. At the end of the incubation, muscles were removed and homogenised in 800 μl lysis buffer to determine protein quantity. Oxidation was determined by acidifying the incubation buffer with 1 ml of H_2SO_4 1 mol/l, and the $^{14}\text{CO}_2$ was trapped by benzethonium hydroxide (Sigma-Aldrich) placed in a 0.5 ml microtube in the sealed glass vial. After 180 min, the microtube was removed and placed in a scintillation vial and radioactivity was counted (Cytoscint; MP Biomedicals, Illkirch, France).

Glucose transport in ex vivo muscle Glucose transport was measured as previously described [29]. Soleus muscles were isolated and preincubated for 10 min in KH buffer, pH 7.4, containing BSA (2 mg/ml), 2 mmol/l sodium pyruvate and 20 mmol/l HEPES. Muscles were then incubated for 45 min in the absence or the presence of insulin (100 nmol/l). For glucose transport, muscles were transferred into another vial containing KH medium supplemented with insulin, D-2-deoxyglucose (0.1 mmol/l) and 2-deoxy-D- ^3H]glucose (14,800 Bq/ml) for 10 min. Muscles were then washed for 1 h in ice-cold PBS and dissolved in 1 mol/l NaOH for a period of 1 h. 2-Deoxy-D- ^3H]glucose 6-phosphate and

2-deoxy-D- ^3H]glucose were differentially precipitated by the use of zinc sulfate (0.3 mol/l), barium hydroxide (0.3 mol/l) and perchloric acid solutions (6%). Radioactivity of each precipitate was quantified in a liquid scintillation fluid.

Insulin secretion from isolated islets Insulin secretion from isolated islets was analysed as previously described [30]. Briefly, islets were isolated from mouse pancreas by collagenase digestion and separated from exocrine tissue by Histopaque gradient. Handpicked islets were placed at 37°C in RPMI medium containing 11 mmol/l glucose for overnight recovery and then distributed in 24-well plates (ten islets per well) for a starvation period of 2 h in RPMI containing 3 mmol/l glucose. Islets were then transferred into Krebs Ringer Bicarbonate HEPES buffer (KRBH) containing 3 mmol/l glucose and 0.07% BSA for a preincubation period of 45 min and then incubated for 1 h in KRBH medium supplemented with 0.5% BSA containing 3, 8 or 16 mmol/l glucose or 35 mmol/l KCl in the absence or presence of LPA (0.1, 1 and 5 $\mu\text{mol/l}$). Notice that incubation with KCl allows the measurement of insulin secretion due to complete depolarisation of the islets. The insulin released in incubation buffers was quantified using an AlphaLISA Human Insulin Research Immunoassay Kit (PerkinElmer) and human standards at the Imaging and Cell Biology Core Facility of the Centre de Recherche du CHUM. Total islet insulin content was measured after acid–ethanol (1.5% HCl, 75% ethanol) extraction.

Histological analysis of pancreas Immediately after dissection, a piece of pancreas was fixed for 24 h in formalin 4%, then maintained at 4°C in 70% ethanol until paraffin embedding and sectioned into sections, 5 μm thick. Sections were stained with haematoxylin and eosin. An image of the entire slice was performed with NanoZoomer Digital Pathology Image (Hamamatsu [v1.2], Hamamatsu City, Japan) and then analysed with NDP scan 2.5.80 from Hamamatsu to count islet number and the number of cells per islet, and to measure islet area and the total analysed sample area.

mRNA quantification Total RNAs were extracted from tissues and cells using the RNeasy mini kit (Qiagen, Hilden, Germany). Total RNA (500 ng) was reverse transcribed for 60 min at 37°C using Superscript II reverse transcriptase (Invitrogen, St Aubin, France) in the presence of random hexamers. A minus reverse transcriptase (RT) reaction was performed in parallel to ensure the absence of genomic DNA contamination. Real-time PCR was performed on 12.5 ng cDNA and 100–900 nmol/l specific oligonucleotide primers in a final volume of 20 μl using the Mesa blue QPCR Master Mix for Sybr (Eurogentec, Angers, France). Fluorescence was monitored and analysed in a StepOnePlus Real-Time PCR system instrument (Applied Biosystems, St Aubin, France).

18S RNA was used to normalise gene expression according to the following formula $2^{-(Ct_{18S} - Ct_{gene})}$ where Ct corresponds to the number of cycles needed to generate a fluorescent signal above a predefined threshold. Oligonucleotide primers were designed using the Primer Express software (Applied Biosystems). The sequence of the oligonucleotide primers is listed in electronic supplementary material [ESM] Table 1.

Statistics Data are presented as means \pm SEM. Bilateral Student's *t* tests were used to compare two groups of data. A two-way ANOVA was applied to detect interaction between treatment and time. Differences were considered significant at $p < 0.05$.

Results

LPA acutely impairs glucose disposal through inhibition of glucose-induced insulin secretion After 9 weeks of diet, HFD mice were obese and prediabetic (see **Methods**). HFD mice also showed a significantly higher (1.9-fold) plasma LPA concentration than ND fed mice (Fig. 1a). This was in agreement with our previous report [19]. To investigate the possible involvement of LPA in the glucose intolerance of HFD mice, glucose tolerance tests were performed 30 min after a single injection of LPA. In both ND and HFD mice, LPA did not modify basal glycaemia (Cont vs LPA, Fig. 1b vs g) and insulinaemia (Cont vs LPA Fig. 1c vs h) measured before glucose load. This indicated that LPA had no direct impact on these variables. Nevertheless, LPA potently impaired glucose tolerance when compared with control (Cont vs LPA, Fig. 1d, e and i, j). Pre-injection of Ki16425, 10 min before LPA, completely blocked the deleterious effect of LPA on glucose tolerance (LPA vs LPA + Ki, Fig. 1d, e and i, j). These data revealed that exogenous LPA exerts a deleterious effect on glucose tolerance through an LPA-receptor-dependent mechanism.

Interestingly, whereas injection of Ki16425 alone did not significantly influence glucose tolerance in ND mice (Cont vs Ki, Fig. 1d, e), it significantly improved glucose tolerance in HFD mice (Cont vs Ki, Fig. 1i, j). This specific beneficial effect of Ki16425 was compared with the higher concentration of plasma LPA in HFD mice than in ND mice (Fig. 1a). These data strongly suggested that enhanced endogenous production of LPA in HFD mice participates in their impaired glucose tolerance.

In an attempt to understand the mechanisms responsible for LPA-mediated impairment of glucose tolerance, plasma insulin was measured during the glucose tolerance test. In both ND and HFD mice, LPA significantly attenuated the induction of insulinaemia generated by the glucose bolus (Cont vs LPA Fig. 1f, k). LPA-mediated inhibition of plasma insulin was completely blocked by pre-injection of Ki16425

(LPA vs LPA + Ki, Fig. 1f, k). In parallel, insulin tolerance was not significantly altered after injection of LPA or Ki16425 (ESM Fig. 1), suggesting no impact on insulin sensitivity. These data demonstrated that LPA-induced impairment of glucose tolerance resulted from inhibition of glucose-induced insulin secretion rather than alteration of insulin sensitivity. In vitro, LPA dose-dependently inhibited glucose-induced insulin secretion by isolated mouse islets (ESM Fig. 2). In contrast, LPA had no influence on basal insulin secretion or on depolarisation-induced insulin secretion by KCl (ESM Fig. 2). A direct impact of LPA on the islets could thus be responsible for its inhibitory influence on glucose-induced insulinaemia.

Chronic treatment with Ki16425 improves glucose tolerance in HFD mice We then investigated whether the beneficial effect of Ki16425 on glucose homeostasis in HFD mice could persist over time. In contrast to the observations made after 30 min, at 24 h after a single injection of Ki16425 glucose tolerance was no more improved when compared with control (ESM Fig. 3). This showed that the beneficial effect of a single injection of Ki16425 on glucose tolerance was transient.

We then examined the effect of chronic treatment with Ki16425 (3 weeks of daily injections). Such treatment had no significant influence on body weight, fat mass or adipose tissue weight (Table 1). Ki16425 treatment had no influence on basal glycaemia preceding the glucose tolerance test (Fig. 2a) but a slight increase in basal insulinaemia was noticed (although the difference did not reach significance) (Fig. 2b). Interestingly, glucose tolerance tests revealed that Ki16425-treatment significantly improved glucose tolerance when compared with control (Fig. 2c, d). This was associated with no significant change in glucose-induced increase in plasma insulin (Fig. 2e). After overnight fasting, Ki16425-treated mice showed no significant change in glycaemia (Fig. 2f) but insulinaemia was significantly higher than in control mice (Fig. 2g). These results showed that chronic treatment with Ki16425 persistently improved the glucose tolerance of HFD mice. This beneficial effect of Ki16425 had no consequence on fasting glycaemia but was surprisingly associated with an increase in fasting insulinaemia, suggesting a possible impact on pancreas function.

To test this hypothesis, the pancreas was examined. Histological analysis of the pancreas from Ki16425-treated mice revealed a significantly higher number of islets when compared with control mice (Fig. 3a; representative scan is shown in ESM Fig. 4). In contrast, the size of the islets (Fig. 3b) and the number of cells per islet (Fig. 3c) remained unchanged. Moreover, no change in the expression of genes involved in beta cell function (insulin, *Pdx1*, *Gck* and *Glut2* [also known as *Slc2a2*]) was observed (Fig. 3d). These results showed that chronic treatment of HFD mice with Ki16425 increased the total number of islet cells suggesting that a compensatory behaviour of the endocrine pancreas

Table 1 Effect of chronic treatment with Ki16425 on HFD-fed mice

Variable	Control (n=6)	Ki16425 (n=6)
Body weight (g)	34.3±2.3	32.4±1.4
Body fat mass (% of total body weight)	34.1±0.5	37.4±1.1
Body lean mass (% of total body weight)	56.6±0.7	57.7±0.9
Subcutaneous adipose tissue (mg)	969±27	1,269±258
Perigonadal adipose tissue (mg)	1,711±198	1,583±292
Pancreas (mg)	249±32	202±17
Liver (mg)	1,136±78	1,051±97
Gastrocnemius muscle (mg)	341±17	359±19
Soleus muscle (mg)	20±1	19±2
Fasted liver triacylglycerols (mg/[g protein])	1.51±0.28	2.07±0.34
Fasted muscle triacylglycerols (mg/[g protein])	7.55±0.67	7.92±1.80
Fasted muscle glycogen (mg/[g protein])	14.7±3.5	14.3±2.5

Data are means ± SEM

might be responsible for Ki16425-mediated increase in fasting insulinaemia.

Chronic treatment with Ki16425 improves insulin tolerance in HFD mice and increases liver glycogen content To investigate the influence of Ki16425 on glucose homeostasis, insulin tolerance tests were performed in HFD mice. Chronic treatment with Ki16425 led to a significant improvement in insulin tolerance when compared with control vehicle (Fig. 4a, b). The decline in blood glucose concentration between 0 and 60 min following insulin injection was faster in Ki16425-treated mice than in vehicle-treated control mice suggesting a better insulin sensitivity. Interestingly, control glycaemia increased again after 60 min, reflecting endogenous glucose production, whereas in Ki16425-treated mice glycaemia stayed at a low level (Fig. 4a). These observations suggest that Ki16425 has an impact on liver glucose metabolism.

To test this hypothesis, livers were examined. Ki16425-treated mice showed no change in liver weight (Table 1) or

triacylglycerol content (Table 1). In contrast, Ki16425-treated mice displayed a significant increase in liver glycogen content when compared with vehicle-treated control mice; this was observed in overnight fasted mice as well as after 18 h re-feeding (Fig. 4c). Glycogen content results from a balance between synthesis and degradation. Livers from Ki16425-treated mice displayed higher gene expression of *Gck* (involved in glucose uptake) and lower expression of *G6pase* (also known as *G6pc*) and *Pepck* (also known as *Pck1*, involved in glucose production) when compared with control mice (Fig. 4d). A trend towards a reduced expression of *Gyk* (involved in neoglucogenesis) was also observed but did not reach significance ($p=0.08$) (Fig. 4d). Although we are aware of the limitations in the functional conclusions that can be drawn from mRNA measurements, these results suggested that Ki16425-mediated increase in liver glycogen content might result from a reduction in glucose release and an increase in glucose uptake in liver. These changes might explain, at least in part, Ki16425-mediated improvement of insulin tolerance and could also

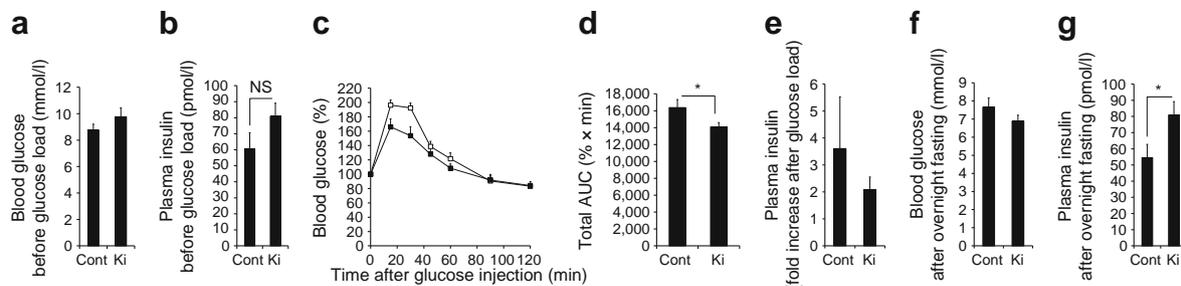


Fig. 2 Chronic treatment with Ki16425 improves glucose tolerance in HFD mice. After 9 weeks of diet, HFD mice received daily injections of Ki16425 (Ki) or vehicle (Cont) for 3 weeks. Mice were fasted for 7 h before conducting a glucose tolerance test. Blood glucose (a) and plasma insulin (b) concentrations measured before glucose load. (c) Blood glucose concentration during glucose tolerance tests, expressed

as per cent of concentration at time 0, and corresponding AUC (d). White squares, vehicle; black squares, Ki16425. (e) Fold change in plasma insulin from 15 min before to 15 min after glucose load. Blood glucose (f) and plasma insulin (g) concentrations after overnight fasting. Values are means ± SEM of six to 12 mice per group. NS, $p=0.072$; * $p<0.05$, comparing indicated values

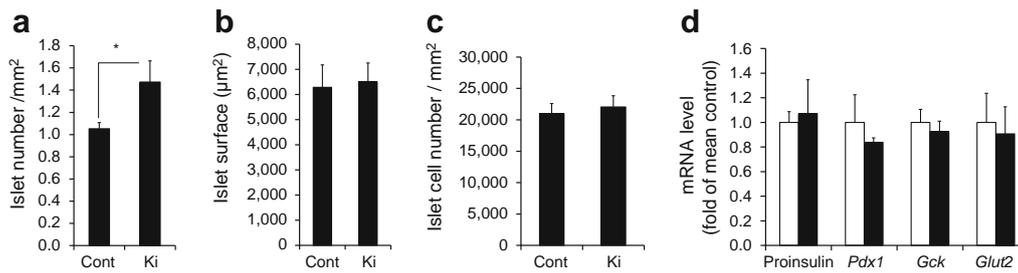


Fig. 3 Chronic treatment with Ki16425 increases islet cell number in HFD mice. HFD mice were treated as described in the legend for Fig. 2, and pancreas was analysed after overnight fasting. Islet number (a), islet surface (b) and number of cells per islet (c) were determined

by histomorphology. Representative scans are shown in ESM Fig. 3. (d) Gene expression in whole pancreas from HFD mice; white bars, vehicle; black bars, Ki16425. Values are means \pm SEM of six to 12 mice per group. * p <0.05, comparing indicated values

contribute to Ki16425-mediated improvement in glucose tolerance.

Chronic treatment with Ki16425 increases glucose use in skeletal muscle Since skeletal muscles play a crucial role in glucose homeostasis, they were also examined after chronic treatment with Ki16425. Neither their weight nor their glycogen and triacylglycerol contents were modified (Table 1). Nevertheless, soleus muscle gene expression analysis

showed a significant increase in *Glut1* (also known as *Slc2a1*) and *Hk2*, but not *Glut4* (also known as *Slc2a4*) mRNAs (Fig. 5a). Although we are aware of the limitations in the functional conclusions that can be drawn from mRNA measurements, these results suggested a change in glucose transport. In ex vivo muscles, a slight increase in 2-deoxy-D-[³H]glucose transport was indeed observed, but the difference did not reach significance (Fig. 5b). Nevertheless, a significant increase in ¹⁴CO₂ production from [¹⁴C]glucose

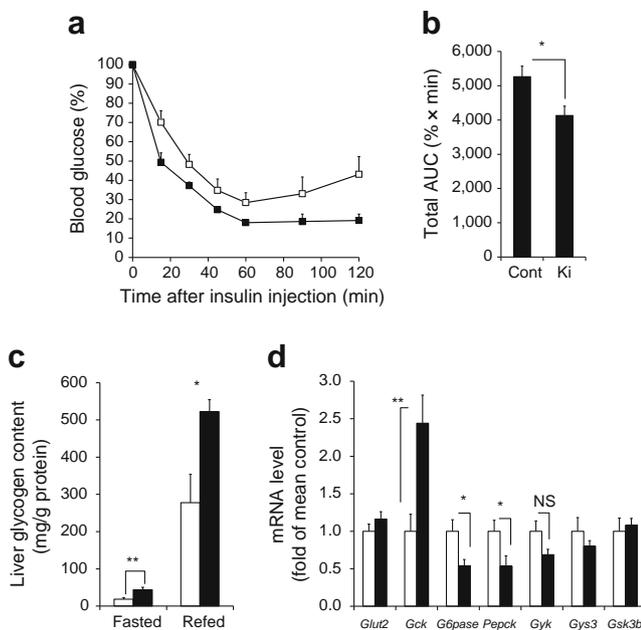


Fig. 4 Chronic treatment with Ki16425 improves insulin tolerance and increases liver glycogen content in HFD mice. HFD mice were treated as described in the legend for Fig. 2, and insulin tolerance tests were conducted after 7 h fasting. (a) Blood glucose concentration during glucose tolerance tests, expressed as per cent of concentration at time 0, and corresponding AUC (b). White squares, vehicle; black squares, Ki16425. (c) Glycogen content after overnight fasting (Fasted) and 18 h after re-feeding (Refed). (d) Gene expression of fasted mice. Values are means \pm SEM of six mice per group; white bars, vehicle; black bars, Ki16425. NS, p =0.08; * p <0.05 and ** p <0.01, comparing indicated values

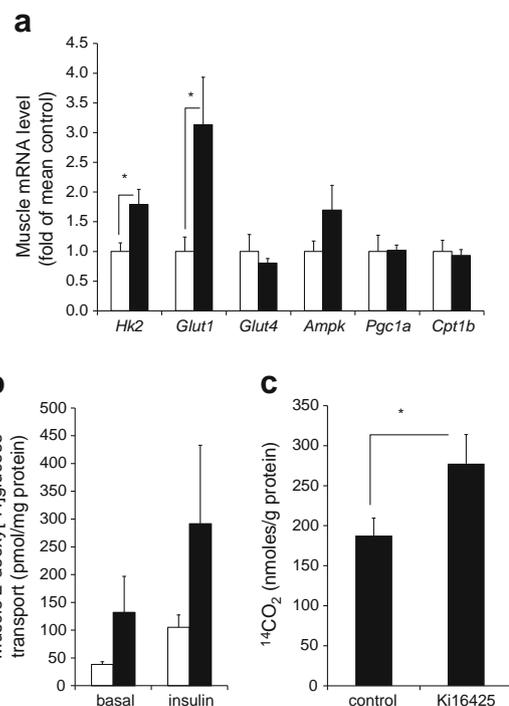


Fig. 5 Influence of mid-term chronic treatment with Ki16425 on glucose metabolism in skeletal muscle of HFD mice. HFD mice were treated as described in the legend to Fig. 2 before quantifying gene expression (a) and measuring 2-deoxy[³H]glucose transport (b) and [¹⁴C]glucose oxidation (c) in ex vivo muscle; white bars, vehicle; black bars, Ki16425. Values are means \pm SEM of six to 12 mice per group. * p <0.05, comparing indicated values

in ex vivo muscle was observed in Ki16425-treated mice when compared with vehicle-treated control mice (Fig. 5c). Although one should remain cautious about extrapolating ex vivo observations to the in vivo situation, our results nevertheless suggested that chronic treatment of HFD-fed mice with Ki16425 could enhance glucose oxidation in muscle and this might contribute, at least in part, to Ki16425-mediated improvement in glucose tolerance.

Discussion

The objective of this work was to study the involvement of LPA in glucose intolerance associated with obesity. We previously reported that transgenic-mediated reduction of LPA synthesis was associated with improved glucose tolerance in HFD-fed mice [19], suggesting that LPA has a negative impact on glucose homeostasis. Here we strengthened this hypothesis by showing the deleterious effect of LPA on glucose tolerance through inhibition of insulin secretion and we demonstrated that chronic pharmacological blockade of LPA receptors with Ki16425 can reverse the deterioration in glucose homeostasis in HFD obese prediabetic mice.

We first showed that acute injection of LPA leads to a strong impairment of glucose tolerance. This observation clearly demonstrates a direct negative influence of LPA on glucose tolerance. This effect is mediated by LPA receptors since the antagonist Ki16425 blocks it. The deleterious effect of LPA was associated with inhibition of glucose-induced insulin secretion with no change in insulin tolerance. These observations strongly suggest that the acute deleterious impact of LPA on glucose tolerance is mediated by inhibition of insulin secretion rather than by an alteration of insulin sensitivity. Moreover, in vitro experiments show that LPA dose-dependently inhibited glucose-induced insulin secretion, directly on isolated islets. This is not in agreement with the findings of Metz et al [31] who reported that glucose-induced insulin secretion was not influenced by LPA in isolated rat islets. Whereas species differences in islet sensitivity to LPA could explain this discrepancy, the way LPA is presented to the islets should also be taken into account. Whereas in our work, LPA was brought to islets in solution in an albumin-containing buffer, Metz et al used an albumin-free vehicle [31]. The latter is not favourable to LPA solubility or its presentation to receptors [32].

Our data also show that inhibition of glucose tolerance is not limited to exogenous LPA and can be extended to endogenous LPA. LPA plasma concentration is higher in HFD mice than in ND mice, and we found that Ki16425 improves glucose tolerance by itself in HFD mice but not in ND mice. Having demonstrated the deleterious effect of exogenous LPA on glucose tolerance, the most likely explanation is that overproduction of endogenous LPA in HFD mice exerts a tonic

inhibitory effect on glucose tolerance that can be alleviated by blocking LPA receptors. Such a conclusion is close to that drawn from our previous report [19] showing that deletion of the LPA-synthesising enzyme autotaxin in adipose tissue was associated with an improvement in glucose tolerance in HFD mice but not in ND mice. Therefore, blocking LPA synthesis or LPA receptors leads to the same metabolic alterations. Increased LPA synthesis in HFD obese mice very likely participates in the deterioration of their glucose tolerance. LPA can therefore be considered to play an important part in the onset of obesity-associated impairment of glucose homeostasis. Thus, autotaxin and LPA receptors represent possible valuable targets for the treatment of metabolic disorders associated with obesity.

We also found that chronic treatment of HFD mice with Ki16425 improved insulin tolerance, increased liver glycogen storage and increased the capacity of muscle to oxidise glucose. These changes are obvious signs of a better disposal of glucose in peripheral organs and are very likely responsible for Ki16425-induced improvement of glucose tolerance. Nevertheless, chronic treatment with Ki16425 also increases fasting insulin. This was initially intriguing to us since increased insulinaemia is usually associated with insulin resistance. It is well established that HFD obesity leads, after a compensatory phase, to progressive beta cell degeneration responsible, at least in part, for the deregulation of insulin production associated with obesity [33]. Histological analysis of the pancreas revealed that the number of pancreatic islets cells was higher in Ki1625-treated mice than in vehicle-treated control mice. Assuming that more than 95% of the cells present in islets are beta cells, it can be concluded that the effect of Ki16425 on the number of beta cells could explain, at least in part, the observed increased in fasting insulin. The influence of Ki16425 on plasma insulin might therefore be interpreted as a protective action against HFD-mediated alteration of beta cells. Nevertheless, we noticed no change in proinsulin mRNA expression, so a possible impact of Ki16425 on the secreting activity of beta cells cannot be excluded. Increased insulin production is recognised as a compensatory mechanism intended to maintain glycaemia when peripheral insulin sensitivity is altered. One can thus propose that the influence of Ki16425 on insulinaemia contributes to Ki16425-mediated improvement in glucose disposal. A possible mechanism could be that increased insulinaemia has an impact on the expression of genes positively involved in glucose homeostasis. This hypothesis is supported by our results showing that Ki16425 treatment affected the expression of several insulin-sensitive genes such as *Gck*, *G6pase* and *Pepck*.

In conclusion, this work presents strong evidence for the role of LPA as a deleterious lipid mediator involved in the deterioration of glucose homeostasis associated with obesity. Moreover, the demonstration of the beneficial effects of the antagonist Ki16425 indicates that LPA receptors might represent potential interesting pharmacological targets to prevent and/or treat the metabolic defects associated with obesity.

Acknowledgements We thank I. Castan-Laurell, V. Bourlier and C. Moro (Inserm U1048, Toulouse, France) and J. Boucher (Joslin Institute, Harvard University, Boston, MA, USA) for fruitful discussions and reviewing the manuscript. We also thank F. Capilla from the service of Histopathology (Inserm US006 CREFRE, Toulouse, France) for her very helpful technical assistance. M. Prentki is the recipient of the Canada research chair in diabetes and metabolism. C. Rancoule is supported by a grant from the Ministère de l'Éducation Nationale de la Recherche et de la Technologie (France). C. Attané is supported by a postdoctoral fellowship from the Canadian Diabetes Association.

Funding This work was supported by grants from Inserm (to J. S. Saulnier-Blache) and the Fondation pour la Recherche Médicale (grant no. DRM20101220459) (to J. S. Saulnier-Blache) and the Canadian Institute of Health Research (to M. Prentki).

Duality of interest The authors declare that there is no duality of interest associated with this manuscript.

Contribution statement All authors participated in the conception and design, or analysis and interpretation of the data, contributed to drafting and revising the manuscript, and gave final approval of the version to be published.

References

- Lee MJ, Wu Y, Fried SK (2010) Adipose tissue remodeling in pathophysiology of obesity. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 13:371–376
- Gutierrez DA, Puglisi MJ, Hasty AH (2009) Impact of increased adipose tissue mass on inflammation, insulin resistance, and dyslipidemia. *Curr Diabetes Rep* 9:26–32
- Karastergiou K, Mohamed-Ali V (2010) The autocrine and paracrine roles of adipokines. *Mol Cell Endocrinol* 318:69–78
- Choi JW, Herr DR, Noguchi K et al (2010) LPA receptors: subtypes and biological actions. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 50:157–186
- Boutin JA, Ferry G (2009) Autotaxin. *Cell Mol Life Sci* 66:3009–3021
- Nakanaga K, Hama K, Aoki J (2010) Autotaxin – an LPA producing enzyme with diverse functions. *J Biochem* 148:13–24
- Kano K, Arima N, Ohgami M, Aoki J (2008) LPA and its analogs – attractive tools for elucidation of LPA biology and drug development. *Curr Med Chem* 15:2122–2131
- Im DS (2010) Pharmacological tools for lysophospholipid GPCRs: development of agonists and antagonists for LPA and S1P receptors. *Acta Pharmacol Sin* 31:1213–1222
- Rancoule C, Pradere JP, Gonzalez J et al (2011) Lysophosphatidic acid-1-receptor targeting agents for fibrosis. *Expert Opin Investig Drugs* 20:657–667
- Ohta H, Sato K, Murata N et al (2003) Ki16425, a subtype-selective antagonist for EDG-family lysophosphatidic acid receptors. *Mol Pharmacol* 64:994–1005
- Boucharaba A, Serre CM, Guglielmi J, Bordet JC, Clezardin P, Peyruchaud O (2006) The type 1 lysophosphatidic acid receptor is a target for therapy in bone metastases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:9643–9648
- Pradere JP, Klein J, Gres S et al (2007) LPA1 receptor activation promotes renal interstitial fibrosis. *J Am Soc Nephrol* 18:3110–3118
- Zhou Z, Subramanian P, Sevilimis G et al (2011) Lipoprotein-derived lysophosphatidic acid promotes atherosclerosis by releasing CXCL1 from the endothelium. *Cell Metab* 13:592–600
- Valet P, Pages C, Jeannot O et al (1998) Alpha2-adrenergic receptor-mediated release of lysophosphatidic acid by adipocytes. A paracrine signal for preadipocyte growth. *J Clin Invest* 101:1431–1438
- Gesta S, Simon MF, Rey A et al (2002) Secretion of a lysophospholipase D activity by adipocytes: involvement in lysophosphatidic acid synthesis. *J Lipid Res* 43:904–910
- Ferry G, Tellier E, Try A et al (2003) Autotaxin is released from adipocytes, catalyzes lysophosphatidic acid synthesis, and activates preadipocyte proliferation. Up-regulated expression with adipocyte differentiation and obesity. *J Biol Chem* 278:18162–18169
- Boucher J, Quilliot D, Praderes JP et al (2005) Potential involvement of adipocyte insulin resistance in obesity-associated up-regulation of adipocyte lysophospholipase D/autotaxin expression. *Diabetologia* 48:569–577
- Rancoule C, Dusaulcy R, Treguer K et al (2012) Depot-specific regulation of autotaxin with obesity in human adipose tissue. *J Physiol Biochem* 68:635–644
- Dusaulcy R, Rancoule C, Gres S et al (2011) Adipose-specific disruption of autotaxin enhances nutritional fattening and reduces plasma lysophosphatidic acid. *J Lipid Res* 52:1247–1255
- Simon MF, Daviaud D, Pradere JP et al (2005) Lysophosphatidic acid inhibits adipocyte differentiation via lysophosphatidic acid 1 receptor-dependent down-regulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma2. *J Biol Chem* 280:14656–14662
- Coy PE, Taneja N, Lee I, Hecquet C, Bryson JM, Robey RB (2002) LPA is a novel lipid regulator of mesangial cell hexokinase activity and HKII isoform expression. *Am J Physiol Ren Physiol* 283:F271–F279
- Keller JN, Steiner MR, Mattson MP, Steiner SM (1996) Lysophosphatidic acid decreases glutamate and glucose uptake by astrocytes. *J Neurochem* 67:2300–2305
- Yea K, Kim J, Lim S et al (2008) Lysophosphatidic acid regulates blood glucose by stimulating myotube and adipocyte glucose uptake. *J Mol Med* 86:211–220
- Fan H, Zingarelli B, Harris V, Tempel GE, Halushka PV, Cook JA (2008) Lysophosphatidic acid inhibits bacterial endotoxin-induced pro-inflammatory response: potential anti-inflammatory signaling pathways. *Mol Med* 14:422–428
- Hashimoto T, Ohata H, Momose K (2004) Itch–scratch responses induced by lysophosphatidic acid in mice. *Pharmacology* 72:51–56
- Subramanian P, Karshovska E, Reinhard P et al (2010) Lysophosphatidic acid receptors LPA1 and LPA3 promote CXCL12-mediated smooth muscle progenitor cell recruitment in neointima formation. *Circ Res* 107:96–105
- Saulnier-Blache JS, Girard A, Simon MF, Lafontan M, Valet P (2000) A simple and highly sensitive radioenzymatic assay for lysophosphatidic acid quantification. *J Lipid Res* 41:1947–1951
- Nahle Z, Hsieh M, Pietka T et al (2008) CD36-dependent regulation of muscle FoxO1 and PDK4 in the PPAR delta/beta-mediated adaptation to metabolic stress. *J Biol Chem* 283:14317–14326
- Dray C, Knauf C, Daviaud D et al (2008) Apelin stimulates glucose utilization in normal and obese insulin-resistant mice. *Cell Metab* 8:437–445
- Peyot ML, Guay C, Latour MG et al (2009) Adipose triglyceride lipase is implicated in fuel- and non-fuel-stimulated insulin secretion. *J Biol Chem* 284:16848–16859
- Metz SA (1986) Lysophosphatidylinositol, but not lysophosphatidic acid, stimulates insulin release. A possible role for phospholipase A2 but not de novo synthesis of lysophospholipid in pancreatic islet function. *Biochem Biophys Res Commun* 138:720–727
- Hama K, Bandoh K, Kakehi Y, Aoki J, Arai H (2002) Lysophosphatidic acid (LPA) receptors are activated differentially by biological fluids: possible role of LPA-binding proteins in activation of LPA receptors. *FEBS Lett* 523:187–192
- Nolan CJ, Damm P, Prentki M (2011) Type 2 diabetes across generations: from pathophysiology to prevention and management. *Lancet* 378:169–181

LEOPARD syndrome-associated SHP2 mutation confers leanness and protection from diet-induced obesity

Mylène Tajan^{a,b}, Aurélie Batut^{a,b}, Thomas Cadoudal^{a,b}, Simon Deleruyelle^{a,b}, Sophie Le Gonidec^{a,b}, Céline Saint Laurent^{a,b}, Maëlle Vomscheid^{a,b}, Estelle Wanecq^{a,b}, Karine Tréguer^{a,b}, Audrey De Rocca Serra-Nédélec^{a,b}, Claire Vinel^{a,b}, Marie-Adeline Marques^{a,b}, Joffrey Pozzo^c, Oksana Kunduzova^{a,b}, Jean-Pierre Salles^d, Maïthé Tauber^d, Patrick Raynal^e, Hélène Cavé^f, Thomas Edouard^d, Philippe Valet^{a,b}, and Armelle Yart^{a,b,1}

^aInstitut National de la Santé et de la Recherche Médicale, U1048, F-31432 Toulouse, France; ^bInstitut des Maladies Métaboliques et Cardiovasculaires, Université de Toulouse, Université Paul Sabatier, F-31432 Toulouse, France; ^cCardiology Unit, University Hospital Center of Rangueil Toulouse, F-31432 Toulouse, France; ^dEndocrine, Bone Diseases, and Genetics Unit, Children's Hospital, University Hospital Center of Purpan Toulouse, F-31024 Toulouse, France; ^eEA4568 Laboratoire Mécanismes des Cardiopathies et Résistances Hormonales dans le Syndrome de Noonan et les Syndromes Apparentés, Université de Toulouse, Université Paul Sabatier, F-31062 Toulouse, France; and ^fInstitut National de la Santé et de la Recherche Médicale Unité Mixte de Recherche S1131, Unité de Formation et de Recherche de Médecine Paris-Diderot-Institut Universitaire d'Hématologie Département de Génétique, Unité Fonctionnelle de Génétique Moléculaire Hôpital Robert Debré, F-75019 Paris, France

Edited by J. G. Seidman, Harvard Medical School, Boston, MA, and approved September 8, 2014 (received for review April 2, 2014)

LEOPARD syndrome (multiple Lentiginos, Electrocardiographic conduction abnormalities, Ocular hypertelorism, Pulmonary stenosis, Abnormal genitalia, Retardation of growth, sensorineural Deafness; LS), also called Noonan syndrome with multiple lentiginos (NSML), is a rare autosomal dominant disorder associating various developmental defects, notably cardiopathies, dysmorphism, and short stature. It is mainly caused by mutations of the *PTPN11* gene that catalytically inactivate the tyrosine phosphatase SHP2 (Src-homology 2 domain-containing phosphatase 2). Besides its pleiotropic roles during development, SHP2 plays key functions in energetic metabolism regulation. However, the metabolic outcomes of LS mutations have never been examined. Therefore, we performed an extensive metabolic exploration of an original LS mouse model, expressing the T468M mutation of SHP2, frequently borne by LS patients. Our results reveal that, besides expected symptoms, LS animals display a strong reduction of adiposity and resistance to diet-induced obesity, associated with overall better metabolic profile. We provide evidence that LS mutant expression impairs adipogenesis, triggers energy expenditure, and enhances insulin signaling, three features that can contribute to the lean phenotype of LS mice. Interestingly, chronic treatment of LS mice with low doses of MEK inhibitor, but not rapamycin, resulted in weight and adiposity gains. Importantly, preliminary data in a French cohort of LS patients suggests that most of them have lower-than-average body mass index, associated, for tested patients, with reduced adiposity. Altogether, these findings unravel previously unidentified characteristics for LS, which could represent a metabolic benefit for patients, but may also participate to the development or worsening of some traits of the disease. Beyond LS, they also highlight a protective role of SHP2 global LS-mimicking modulation toward the development of obesity and associated disorders.

rasopathies | ras/MAPK | energy metabolism | adipose tissue

LEOCARD syndrome (multiple Lentiginos, Electrocardiographic conduction abnormalities, Ocular hypertelorism, Pulmonary stenosis, Abnormal genitalia, Retardation of growth, sensorineural Deafness) (MIM 151100) (LS), also named Noonan syndrome with multiple lentiginos (NSML), is a rare autosomal dominant developmental disorder characterized by a phenotypic triad associating heart defects, facial dysmorphism, and short stature, as well as defining traits, including lentiginos and deafness. With related diseases sharing all or some of these symptoms (Noonan, Costello, cardio-facio-cutaneous syndromes, neurofibromatosis type I), it belongs to the family of Rasopathies, named after the mutated genes encoding actors of the Ras/mitogen-activated protein kinases (MAPK) signaling cascade (1).

More than 80% of patients with LS heterozygously carry a missense mutation in the *PTPN11* gene, encoding the ubiquitous tyrosine phosphatase SHP2 (Src-homology 2 domain-containing

phosphatase 2) (2). SHP2 plays pivotal roles in development, as revealed by embryonic lethality and gastrulation defects of its total inactivation in various organisms (worm, fly, and mice), and by the impact of its targeted deletion on the development or function of many organs (brain, heart, and lung) (3). Genetic and functional evidences have pinpointed that these effects are linked to SHP2's roles in transducing signaling fluxes in response to many growth factors/hormones. Indeed, by dephosphorylating specific tyrosine residues, it regulates key intracellular signaling pathways [Ras/MAPK, phosphoinositide-3 kinases (PI3K)/Akt, target of rapamycin (TOR) kinase, Src family kinase (SFK), Rho GTPases, S6 kinase (S6K), and JAK/STAT pathway] to adapt cell fate to variations of the environment (proliferation, migration, and metabolism) (4–9).

Central to the understanding of LS pathophysiology has been to determine the outcomes of LS-causing SHP2 mutations. Biochemical studies have revealed that LS-associated mutations result in the reduction of SHP2's catalytic activity (10–12). On

Significance

LEOPARD syndrome (multiple Lentiginos, Electrocardiographic conduction abnormalities, Ocular hypertelorism, Pulmonary stenosis, Abnormal genitalia, Retardation of growth, sensorineural Deafness; LS) is a rare genetic disease associating various developmental defects mainly caused by inactivating mutations of the tyrosine phosphatase SHP2 (Src-homology 2 domain-containing phosphatase 2). SHP2 is a key regulator of essential signaling pathways (MAPK, PI3K), which confer on SHP2 major roles in development and metabolism control. However, nothing is known about the metabolic status of LS. We thus performed an extensive metabolic exploration of an original LS mouse model. These mice display a lean phenotype (reduced adiposity, improved carbohydrate metabolism), translating into resistance to obesity and associated disorders upon obesogenic diet. This phenotype correlated with defective adipogenesis, better insulin signaling, and enhanced energy expenditure and was partially corrected by MAPK inhibition. Preliminary data in LS patients are in agreement with these findings.

Author contributions: M. Tajan, P.R., H.C., T.E., P.V., and A.Y. designed research; M. Tajan, A.B., T.C., S.D., S.L.G., C.S.L., M.V., E.W., K.T., C.V., M.-A.M., J.P., and A.Y. performed research; A.D.R.S.-N., J.-P.S., M. Tauber, and H.C. contributed new reagents/analytic tools; M. Tajan, T.C., S.L.G., O.K., T.E., P.V., and A.Y. analyzed data; and M. Tajan, T.E., P.V., and A.Y. wrote the paper.

The authors declare no conflict of interest.

This article is a PNAS Direct Submission.

¹To whom correspondence should be addressed. Email: armelle.yart@inserm.fr.

This article contains supporting information online at www.pnas.org/lookup/suppl/doi:10.1073/pnas.1406107111/-DCSupplemental.

a functional point of view, although it has been reported that LS mutants display a dominant negative activity on Ras/MAPK activation (12, 13), other studies have demonstrated that LS-associated mutations can up-regulate this same pathway, through mechanisms that remain elusive to date (14–16). Whether LS mutants-triggered MAPK dysregulation participates in the development of the disease is unknown, and MAPK-independent events have been recently implicated in LS pathogenesis. First, phosphatase-independent regulation of p53-dependent apoptosis has been proposed to drive some aspects of LS (17). Second, we and other have recently shown that dysregulation of the PI3K pathway is causally linked to the pathophysiology of LS: Indeed, LS mutants can induce PI3K hyperactivation, thereby promoting a hypertrophic phenotype in cardiomyocytes in vitro (18). Furthermore, with using the first mouse model of LS, carrying the Y279C mutation (*Ptpn11*^{Y279C/+} mice), Marin et al. nicely demonstrated that the PI3K/mTOR pathway was hyperactivated, and that rapamycin-mediated mTOR inhibition could alleviate the hypertrophic cardiomyopathy (HCM) developed by these mice (13). These data were confirmed in transgenic mice overexpressing in the cardiomyocyte another LS mutant of SHP2 (Q510E mutation), which could recover from their HCM upon rapamycin treatment (19). However, whether PI3K/mTOR hyperactivation is responsible for other traits of the disease, and whether other signaling dysfunctions are involved in LS ontology, remain to be established.

In addition to its pleiotropic roles in development, SHP2 also plays key functions in homeostasis maintenance, notably by regulating energetic metabolism. Indeed, although an initial study using hemizygous *Ptpn11*^{+/-} mice did not reveal any obvious metabolic phenotype, transgenic mice expressing a dominant negative mutant of SHP2 have been shown to exhibit impaired glucose homeostasis (20, 21). Moreover, different studies using tissue-specific knockouts have highlighted SHP2 involvement in metabolism regulation. Indeed, SHP2 plays a key role in leptin sensitivity in neurons and in central energy balance control (22–24). Moreover, in muscle and in liver, SHP2 appears to differently modulate insulin sensitivity, although it also promotes insulin biosynthesis in the pancreas, uncovering a complex role of SHP2 in tuning glucose homeostasis (25–28). Finally, recent studies have revealed a potential, albeit controversial, role for SHP2 in regulating adipogenesis in vitro and in vivo (29–31).

These critical impacts of SHP2 loss of function in multiple aspects of metabolism regulation infer that its dysregulation in LS can give rise to metabolic perturbations, which could have significant consequences for the patients. However, the metabolic status associated with LS has not been explored to date. In the present study, we took advantage of an original knock-in mouse model, carrying the common LS-associated, T468M, mutation of SHP2, to perform an extensive metabolic exploration. We clearly showed that these mice have reduced adiposity and increased energy expenditure, associated with improved overall metabolic profile, resulting in resistance to diet-induced obesity (DIO) and associated-adverse effects when challenged with high fat diet (HFD). Moreover, chronic treatment of LS mice with low doses of MEK inhibitor, but not with rapamycin, resulted in weight gain and increase in adiposity, whereas both treatments decreased glucose tolerance. Interestingly, preliminary data provide first evidence, to our knowledge, that patients with LS may display a similar phenotypic trait.

Results

***Ptpn11*^{T468M/+} Mouse Model Recapitulates LS Features.** To explore the global outcomes of LS-causing SHP2 mutations, we generated a knock-in mouse model carrying the T468M mutation, one of the two most frequent SHP2 mutations borne by LS patients (Fig. 1A and Fig. S1). We first performed a general phenotyping of the *Ptpn11*^{T468M/+} mouse model to assess whether this strain recapitulated the features of LS. *Ptpn11*^{T468M/+} mice exhibited a slight growth and weight retardation compared with their WT littermates (Fig. S2A), as already observed in another LS mouse model (13). Computed tomography analysis revealed reduced skull length, increased interorbital distance, and significantly increased skull width-to-length ratio, indicating that *Ptpn11*^{T468M/+} mice showed signs of craniofacial abnormalities (Fig. S2B and Table S1). Strikingly, *Ptpn11*^{T468M/+} mice also display splenomegaly (Fig. S2C), a feature that was not found in a small cohort of *Ptpn11*^{Y279C/+} animals (13). Moreover, these animals had significantly reduced blood pressure, coming with decreased pulse height and heart rate (Fig. S2D–F). Regarding cardiac function, 30-wk-old *Ptpn11*^{T468M/+} mice exhibited a significant increase in heart/body ratio compared with WT mice (Fig. S2G). Subsequent assessment of left ventricular function using M-mode

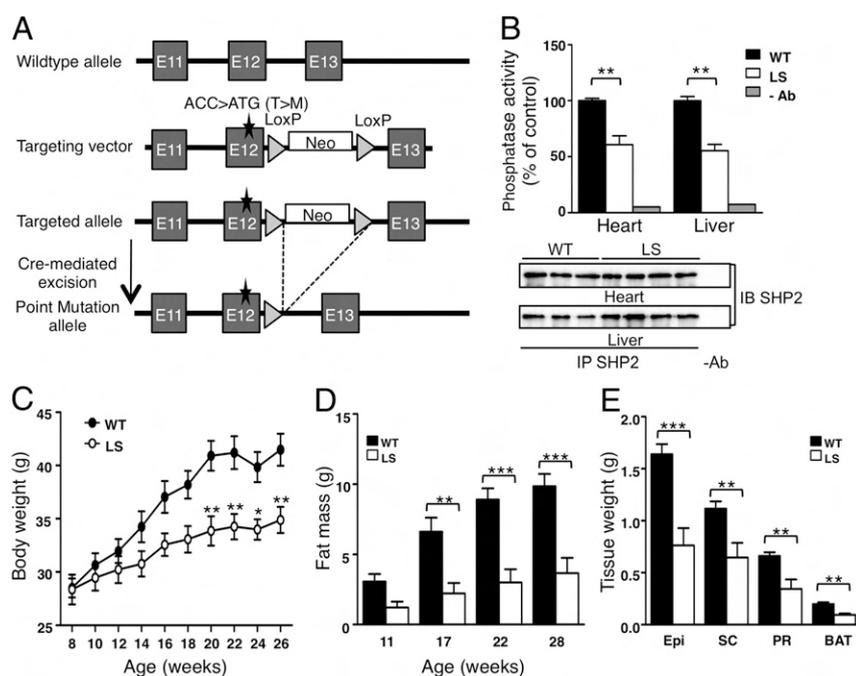


Fig. 1. LS mice display reduced body mass and adiposity. (A) Schematic representation of the homologous recombination strategy. (B) SHP2 was immunoprecipitated from heart and liver extracts of WT and LS mice (3–4 animals per group), and then a phosphatase assay was conducted by using phospho-Src peptide as a substrate. A control without antibody was also performed (-Ab) (** $P < 0.01$, unpaired two-tailed Student t test). (Lower) Quality and specificity of immunoprecipitations were verified by Western blot. (C–E) WT ($n = 8$) and LS ($n = 6$) animals were fed a normal diet. At indicated ages, they were weighed (C) or placed in an EchoMRI apparatus to determine fat mass (D) (* $P < 0.05$; *** $P < 0.001$, two-way ANOVA plus Bonferroni post hoc test). At 30 wk of age, animals were euthanized, and then their fat pads were weighed (BAT, brown adipose tissue; Epi, epididymal; PR, perirenal; SC, s.c.) (** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, unpaired two-tailed Student t test) (E).

echocardiography revealed an increase in left ventricular internal diameter in *Ptpn11*^{T468M/+} animals and thinning of their intraventricular septum and left ventricular posterior wall, two features evoking dilated cardiomyopathy (DCM) (Table S2). At the functional level, hearts from *Ptpn11*^{T468M/+} animals display cardiac dysfunction, as shown by reduced stroke volume and proportional decrease in fractional shortening (FS) and ejection fraction (EF). Younger, 15-wk-old, LS mice, displayed enlargement of the left ventricle, revealing early stage of hypertrophy, suggesting that *Ptpn11*^{T468M/+} mice develop a HCM that evolves to DCM, as reported in another LS mouse model (13). Moreover, analysis of insulin-evoked signaling in heart extracts showed increased Akt phosphorylation and decreased Erk1/2 phosphorylation (Fig. S2H), as previously observed in *Ptpn11*^{Y279C/+} mice (13). Thus, this *Ptpn11*^{T468M/+} mouse model recapitulates the main features of LS, in particular growth retardation, craniofacial abnormalities, and cardiomyopathy. Thereafter, *Ptpn11*^{T468M/+} mice will be referred to as LS animals.

Because LS-causing SHP2 mutations have been shown to inactivate SHP2's phosphatase activity in vitro (10, 11, 18), we next assessed the impact of the T468M mutation in vivo. To this aim, SHP2 was immunoprecipitated from heart and liver extracts, and phosphatase assays were performed by using standard phosphotyrosine substrate. As shown in Fig. 1B, phosphatase activity was reduced by one-half in tissues from LS mice compared with WT animals. Thus, this result shows that the heterozygous expression of the T468M mutant of SHP2 translates into a 50% decrease in SHP2 activity in vivo, similarly to what was observed for another LS mutation (13).

LS Mice Display Reduced Body Weight and Adiposity. To explore the metabolic status associated with LS condition, we monitored the weight of WT and LS males. As shown in Fig. 1C, LS mice gained less weight than their WT littermates (16% less at 26 wk of age), despite similar food intake between genotypes [WT ($n = 7$): 4.97 ± 0.32 g/d; LS ($n = 12$): 5.43 ± 0.33 g/d, not significant, unpaired two-tailed Student t test]. To further document this phenotype, we analyzed body composition at various ages. Lean mass was not different between genotypes, although the size of some organs was significantly reduced (Fig. S3 A–C), and lean mass proportion was significantly increased (Fig. S3 D–F), suggesting that reduced weight in LS was not primarily due to lean mass diminution. In contrast, fat mass was significantly decreased in LS mice, those animals displaying in average two-thirds less fat mass than their WT littermates (Fig. 1D and Fig. S3G). Coherently, epididymal, s.c., and perirenal white adipose tissues, and brown adipose tissue (BAT), were significantly smaller in LS animals (Fig. 1E and Fig. S3H). In line with reduced fat mass, plasma levels of insulin and leptin were significantly decreased in LS mice, leptinemia being more than fourfold reduced (Table 1). Thus, from this set of data, we conclude that systemic expression of a LS mutation of SHP2 results in leaner mice with a strong reduction of adiposity.

Impaired Adipocyte Differentiation in LS Mice. We next sought the origin of reduced adiposity in LS mice. To this aim, we determined whether LS mice-derived adipose tissue consisted of smaller and/or fewer adipocytes, by measuring the size of fat cells isolated from epididymal fat pads. As shown in Fig. 2A, the size distribution of adipocytes derived from LS mice revealed a depletion of the small adipocyte subpopulation for the benefit of bigger cells. Consequently, the mean diameter was significantly increased for LS adipocytes (Fig. 2A, *Inset*). Of note, adipocyte enlargement in LS mice could also participate to the reduction of adiponectin level (Table 1). Taking into account the total epididymal fat pads weights, we could estimate that adipocyte number was reduced by one-half in LS animals compared with their controls. Increased proportion of bigger adipocytes was also observed in s.c. adipose tissue (Fig. S4A). Thus, we conclude that LS animals have less adipocytes, in particular in their epididymal adipose tissue.

Considering the lower amount of adipocytes and the increased proportion of large adipocytes in LS mice derived-adipose tissues, we explored the possibility of impaired adipogenesis in LS mice. Indeed, a positive role for SHP2 in adipogenesis has already been identified in vitro and in vivo (29, 30). We isolated the stroma vascular fraction (SVF) from epididymal and s.c. adipose tissues of WT and LS mice and challenged the ability of SVF-derived preadipocytes to differentiate into adipocytes in vitro. The amount of refringent, lipid droplet-accumulating cells (i.e., differentiated preadipocytes) seemed reduced for LS-mice derived SVFs compared with those from WT littermates (Fig. 2B). Moreover, whereas expression of differentiated preadipocyte markers (*aP2*, *HSL*, *Adiponectin*) considerably rose during the differentiation process in WT cells, it was significantly delayed in LS-derived cells isolated from epididymal adipose tissue (Fig. 2C). Expression of those genes was mostly blocked even in SVF-derived precursors from s.c. adipose tissue (Fig. 2D). In addition, the expression of *PPAR* γ 2, a major inducer of adipocyte differentiation, was also dampened down in comparison with WT cells (Fig. 2 C and D). Thus, these data indicate that expression of a LS-associated SHP2 mutant impairs adipocyte differentiation. Furthermore, we observed that expression of the anti-adipogenic factor *Pref-1* was increased in SVF from epididymal adipose tissue (Fig. S4B) and that the proadipogenic factor IGF-I was significantly reduced in plasma from young LS mice (Fig. S4C). Altogether, these results suggest that LS condition is associated with defective adipogenesis, which could explain the reduced adiposity of LS mice.

LS Mutation Impacts Adipose Tissue Activity. Because adipose tissue amount is also the resultant of its metabolic activity, we sought changes in adipose tissue metabolism. Thus, we explored the expression level of key adipocyte metabolism-regulating genes in LS and WT mice. As shown in Fig. 3A, expression of lipogenesis-regulating genes (*aP2*, *SREBP1*, *FAS*) was similar between WT and LS mice. In contrast, there was a significant overexpression of two key lipases (*HSL*, *ATGL*) in the adipose tissue of LS mice, suggesting that lipolysis could be enhanced in LS adipose tissue. Supporting this view, basal glycerol release, taken as readout of lipolytic activity, was strongly increased in LS adipocytes isolated from epididymal fat pads (Fig. 3B). This higher rate of glycerol release was also observed in LS adipocytes at all tested doses of isoproterenol, which was probably due to increased basal lipolysis. Therefore, this finding suggests that adipose tissues in LS mice have an enhanced lipolytic activity, which could contribute to their defect in adipose tissue maintenance.

LS Condition Is Associated with a Lean, but Not Lipodystrophic, Phenotype. Given the significant reduction of fat pads in LS mice, we next assessed its consequences on whole body metabolism. Indeed, reduced adiposity can define lipodystrophy or leanness, depending on whether it associates with lipotoxicity and insulin resistance.

First, we evaluated whether global lipid metabolism was affected by the reduced amount of fat tissue. Interestingly, plasma cholesterol, triglycerides, and free fatty acids concentration were not different between genotypes (Table 1). Moreover, lipid deposits in liver and muscle were not increased in LS mice, and were even significantly reduced, as revealed by decreased triglycerides content, which came along with significantly lower plasma alanine transaminase (ALT) concentration (Table 1). Thus, this set of data suggests that LS mice can efficiently manage lipids despite their reduced adiposity.

Then, to explore carbohydrate metabolism, WT and LS animals were assayed for oral glucose tolerance test (OGTT). As shown in Fig. 4A, at 11 wk of age, LS mice already displayed a better glucose tolerance than their WT littermates, a difference that was even more prominent in older, 28-wk-old animals. Improved glucose tolerance in LS mice correlated with a significant reduction of their insulinemia measured before and 15 min after glucose bolus (Fig. 4B) and with better insulin tolerance (Fig. 4C)

Table 1. Metabolic parameters of 30-wk-old, fasted WT and LS mice fed a ND or a HFD

Metabolic parameters	ND		HFD	
	WT (n = 8)	LS (n = 6)	WT (n = 15)	LS (n = 13)
Plasma				
Glycemia, g/L	1.32 ± 0.09	1.15 ± 0.07	1.70 ± 0.09	1.46 ± 0.07*
Insulinemia, pg/mL	2117 ± 423	527 ± 118**	6424 ± 1611	791 ± 183*
ALT, U/L	26.38 ± 2.08	17.17 ± 1.66**	96.40 ± 15.57	39.46 ± 13.86*
AST, U/L	59.38 ± 6.05	44.33 ± 2.59	103.60 ± 9.80	61.54 ± 6.39**
Fructosamine, μmol/L	n.d.	n.d.	211.1 ± 12.4	155.4 ± 10.7*
Cholesterol, mmol/L	2.58 ± 0.19	2.48 ± 0.25	4.16 ± 0.19	3.37 ± 0.21**
Triglycerides, mmol/L	1.52 ± 0.16	1.35 ± 0.22	1.30 ± 0.15	1.32 ± 0.14
FFA, mmol/L	0.37 ± 0.02	0.46 ± 0.06	0.42 ± 0.08	0.52 ± 0.08
Leptin, ng/mL	30.55 ± 5.29	7.21 ± 3.03**	88.00 ± 9.74	36.85 ± 7.78**
Adiponectin, μg/mL	6.68 ± 0.33	5.20 ± 0.21**	5.68 ± 0.23	5.10 ± 0.31
Tissues				
Liver triglycerides, mg/g liver	63.27 ± 2.92	36.65 ± 3.74***	Fig. 6	Fig. 6
Muscle triglycerides, g/g prot	0.12 ± 0.02	0.06 ± 0.02*	Fig. 6	Fig. 6

Data represent mean ± SEM. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, unpaired two-tailed Student t test. ALT, alanine transaminase; AST, aspartate transaminase; FFA, free fatty acids; n.d., not determined.

compared with WT animals. Consistent with this profile, insulin-induced glucose uptake was significantly increased in isolated adipocytes from LS mice-derived epididymal adipose tissue (Fig. 4D). Importantly, the doses of insulin necessary to induce glucose transport and to reach a plateau were lower in LS adipocytes, suggesting an increased insulin sensitivity of LS cells. Supporting these findings, following insulin injection, Akt and Erk1/2 phosphorylations were augmented in insulin-sensitive tissues from LS animals compared with WT mice, notably in adipose tissue (Fig. 4E). To determine whether this effect was a direct consequence of SHP2 mutants expression, two LS-causing SHP2 mutants (T468M, Y279C), or WT SHP2 as a control, were expressed in lieu of endogenous SHP2 into murine embryonic fibroblasts (MEF), and those cells were stimulated with insulin. Interestingly, insulin-induced Akt and Erk1/2 phosphorylations were both significantly increased

in LS mutant-expressing cells, showing that expression of LS mutants into cells was sufficient to enhance insulin signaling (Fig. 4F and G). Altogether, this result demonstrates that reduced adiposity in LS is associated with improved glucose tolerance, which can conceivably arise from enhanced insulin sensitivity, suggesting that LS mice display a lean, but not lipodystrophic, phenotype.

Chronic Treatment of LS Mice with MEK Inhibitor, but Not Rapamycin, Results in Weight and Adiposity Gain. LS mutants have been reported to affect the activation of the PI3K/Akt/mTOR and MAPK pathways in different biological systems (12–16, 18). Consistently, in our study, we observed that expression of the T468M mutant of SHP2 resulted in insulin-evoked PI3K/Akt and MAPK pathway hyperactivation in several metabolic tissues.

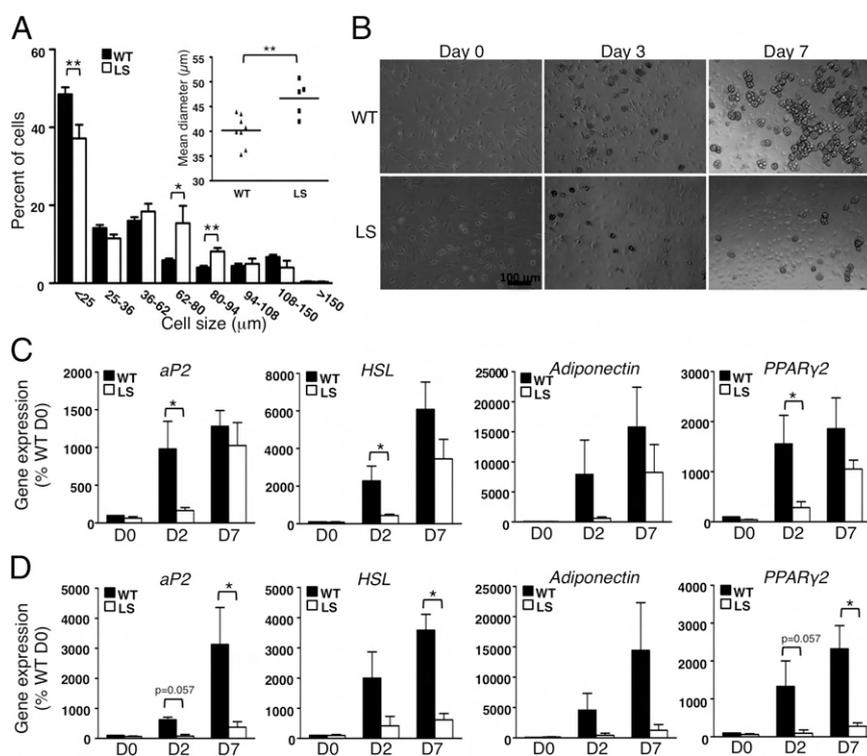


Fig. 2. Impaired adipocyte differentiation potential of LS-derived SVF cells. (A) Adipocytes from epididymal adipose tissue of 30-wk-old WT ($n = 8$) and LS ($n = 6$) mice were isolated and their size was determined by using a Multisizer Coulter apparatus. (A Inset) Mean adipocyte diameter was calculated. Individual value and mean are represented (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$, unpaired two-tailed Student t test). (B–D) Six- to 8-wk-old WT and LS mice were euthanized (10 mice per group, $n = 3$), then their adipose tissues were withdrawn, SVF cells were purified, seeded into culture, and incubated in adipocyte differentiation medium. Representative photographs were taken at indicated times for epididymal adipose tissue-derived SVF cells (B). At indicated times, SVF cells derived from epididymal (C) or s.c. (D) adipose tissues were collected, then their RNAs were purified and expression of the indicated genes was determined by real-time PCR (* $P < 0.05$, Mann-Whitney nonparametric test).

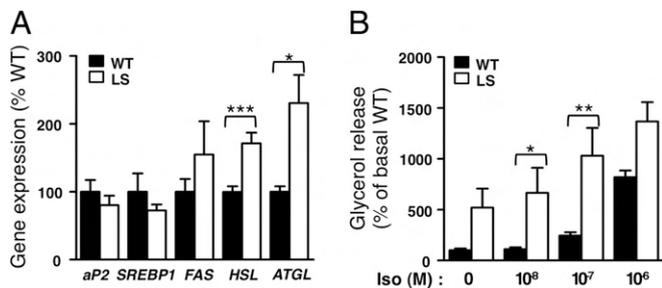


Fig. 3. Increased lipolysis in adipocytes from LS mice. Adipocytes were isolated from epididymal adipose tissue of 30-wk-old WT ($n = 8$) and LS ($n = 6$) mice. (A) Adipocyte RNAs were extracted, and then expression of indicated genes was determined by real-time PCR ($*P < 0.05$; $***P < 0.001$, unpaired two-tailed Student t test). (B) Adipocyte aliquots from epididymal adipose tissue were treated with the indicated doses of isoproterenol (Iso), and released glycerol was quantified ($*P < 0.05$; $**P < 0.01$, two-way ANOVA plus Bonferroni post hoc test).

Therefore, we assessed the impact of chronic inhibition of those pathways on the metabolic phenotype of LS mice. To this aim, we treated 25-wk-old LS and WT animals for 1 mo with the mTOR inhibitor rapamycin, which has been proven to efficiently revert PI3K/Akt/mTOR hyperactivation-driven HCM in another LS mouse model (13), or with the MEK inhibitor PD0325901 (Fig. S5A). At the end of the treatment, PD0325901-injected mice, but not vehicle- or rapamycin-treated animals, had significantly gained weight (Fig. 5A). Interestingly, weight gain correlated with significant increase in adiposity for LS mice receiving MEK inhibitor, and concurrent decrease of lean mass proportion (Fig. 5B and C). Moreover, we performed an OGTT before and after 2 wk of treatment. As shown in Fig. 5D, glucose tolerance, which inversely correlates with the area under glucose curve (AUC), was strongly reduced upon rapamycin and, to a lesser extent, after PD0325901 treatment, which may arise from direct, signaling-dependent, or indirect, adiposity-related effects on in-

sulin sensitivity, respectively. After 2 wk of treatment, food intake was not significantly different among the three groups (Fig. 5E), whereas PD0325901-treated mice had already gained significant weight [Ctrl ($n = 5$): $102.9 \pm 1.27\%$ vs. PD ($n = 5$): $110.1 \pm 1.75\%$, $*P < 0.05$, unpaired two-tailed Student's t test]. Of note, with the exception of food intake, similar results were obtained with WT animals (Fig. S5B–F). Altogether, these results suggest that MAPK hyperactivation in LS mice may participate, at least in part, to the setting of their lean phenotype.

LS Mice Are Resistant to HFD-Induced Obesity and Associated Pathologies.

To get further insights into the metabolic consequences of LS-associated SHP2 mutation, we then challenged LS and WT mice to HFD. Interestingly, LS mice gained much less weight than their control littermates and remained lean, whereas WT animals develop an obese phenotype (Fig. 6A). This lower weight gain correlated with a significant reduction of fat mass at all tested ages (Fig. 6B and Fig. S6A). Global lean mass was equivalent between genotypes, and lean mass proportion was coherently increased in LS mice (Fig. S6B and C). Moreover, s.c., perirenal, and brown adipose tissue deposits were significantly smaller in HFD-fed LS animals, although the epididymal fat pads were not different between genotypes, which may result, at least in part, from a saturating effect in WT animals (Fig. 6C and Fig. S6D). The amount of small adipocytes was lower in adipose tissue from LS mice, evoking a defect in recruiting new adipocytes for differentiation, which could participate to their reduced fat gain (Fig. S6E). Noticeably, the proportion of bigger adipocytes was markedly increased in LS mice, suggesting that LS adipose tissue can, to a certain extent, compensate the reduced cell number through increased hypertrophy, which could also explain that the weight of epididymal fat pads caught up with those of WT animals. Nevertheless, lipolytic activity was still significantly enhanced in adipocytes derived from HFD-fed LS mice (Fig. S6F). Regarding adipose tissue secretions, leptin plasma level was much lower in LS animals, consistent with lower fat mass (Table 1). Moreover, whereas adiponectin level decreased under HFD in WT animals, it remained almost constant in LS animals. Altogether, these data reveal that LS mice are somehow resistant to HFD-induced obesity.

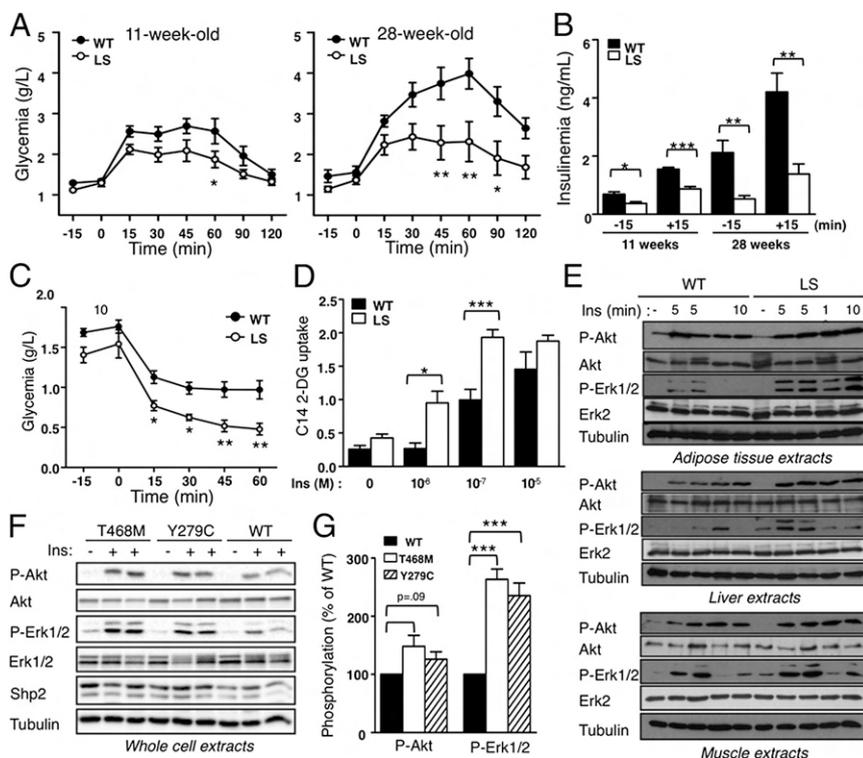
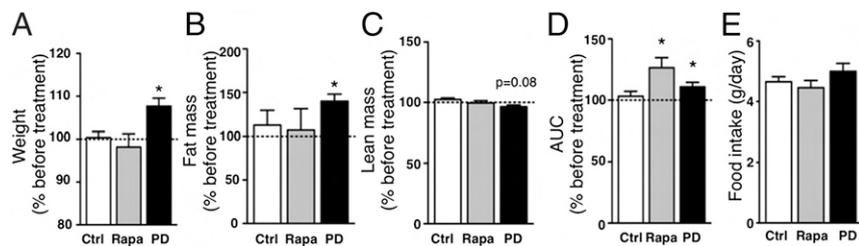


Fig. 4. Improved carbohydrate metabolism in LS mice. (A and B) At indicated ages, 6-h starved WT ($n = 8$) and LS ($n = 6$) mice were fed with 3 g/kg glucose. (A) Glycaemia was determined by colorimetry at indicated times ($*P < 0.05$; $**P < 0.01$, two-way ANOVA plus Bonferroni post hoc test). (B) Insulin levels were determined by ELISA before (–15 min) and after (+15 min) glucose load ($*P < 0.05$; $**P < 0.01$; $***P < 0.001$, unpaired two-tailed Student t test). (C) Twenty-five-wk-old animals were injected i.p. with insulin, then glycaemia was determined by using a glucometer ($*P < 0.05$; $**P < 0.01$, two-way ANOVA plus Bonferroni post hoc test). (D) Isolated adipocytes from 30-wk-old WT ($n = 6$) and LS ($n = 6$) mice were incubated with ^{14}C 2-deoxyglucose (^{14}C 2-DG) and stimulated or not with the indicated doses of insulin, then ^{14}C 2-DG uptake was determined ($*P < 0.05$; $***P < 0.001$, two-way ANOVA plus Bonferroni post hoc test). (E) Sixteen-week-old animals were i.p. injected with 10 mU/g insulin or PBS (–) as a control, euthanized after 5 or 10 min, then their tissues were withdrawn and protein extracts were analyzed by Western blot. (F and G) MEFs expressing SHP2 WT or its LS derivatives (T468M, Y279C) were stimulated or not with insulin (Ins), then lysed and processed for Western blot (F). Western blots from four independent experiments were quantified with Image Lab (Bio-Rad) ($*P < 0.05$; $***P < 0.001$, paired two-tailed Student t test) (G).

Fig. 5. Chronic MEK inhibition induces weight and adiposity gains in LS mice. LS animals were treated with vehicle (Ctrl, $n = 9$), PD0325901 (PD, $1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$, $n = 5$), or rapamycin (Rapa, $2 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$, $n = 8$) for 1 mo. (A) Animals were weighed before and after treatment, and weight gain was calculated for each animal. (B and C) Before and after treatment, animals were placed in an EchoMRI apparatus, fat (B) and lean (C) masses were determined, and fat gain was calculated. (D) Animals were subjected to an OGTT before and after 2 wk of treatment, the AUC were determined, and AUC variation was calculated. Statistical significance was assessed by using a paired two-tailed Student t test ($*P < 0.05$). (E) Animals were placed in individual cages and food pellets were weighted over a 2-wk period (nonsignificant, unpaired two-tailed Student t test).



We next analyzed the development of obesity-associated complications in LS mice. OGTT experiments revealed that, throughout the obesogenic diet, LS mice appeared less gluco-intolerant than their control littermates (Fig. 6D), which was associated with lower glycaemia and decreased amount of glycated proteins (fructosamine) in plasma of LS mice (Table 1). In addition, while fasted and glucose-induced insulinemia rose in WT mice throughout the diet, they remained similar in LS mice, resulting in a marked reduction of insulin levels in LS animals compared with their control littermates (eightfold and fourfold, respectively, at the end of the HFD period) (Fig. 6E and Table 1). Coherently, homeostasis model assessment of insulin resistance (HOMA-IR) calculation showed that after 18 wk of HFD, LS mice remained much less resistant to insulin than their control littermates (1.25 ± 0.35 vs. 10.31 ± 2.6 , $*P < 0.05$, unpaired two-tailed Student's t test with Welch correction). Consistent with this observation, LS mice also displayed improved insulin tolerance during insulin tolerance test (ITT) (Fig. 6F). Moreover, we measured a significant reduction of ALT, aspartate transaminase, and cholesterol in plasma from LS mice (Table 1) as well as of ectopic lipid deposits in liver and muscle (Fig. 6G–I). Hepatic triglycerides were almost reduced by half in LS mice (Fig. 6G), which could contribute to their reduced liver weight (Fig. S6G). Altogether, these data document

a protection toward obesity and its associated deleterious effects in LS mice.

Lean Phenotype Is Associated with Enhanced Energy Expenditure at the Whole Body Level. Given the lean and obesity-resistance phenotype of the LS mice, we next searched at which level the energetic equilibrium could be imbalanced in these animals. Food intake was identical for WT and LS mice, both under normal diet (ND) and HFD, excluding that this phenotype primary arose from reduced calories supply (Fig. 7A). Moreover, we determined that feces from WT and LS animals contained equivalent amounts of energy, suggesting that these animals do not display intestinal absorption defects (Fig. 7B). In addition, we did not observe significant changes in body temperature (Fig. S7A). We thus hypothesized that LS-associated SHP2 mutations might improve energetic substrates management. Therefore, we determined energy expenditure (EE) in WT and LS mice through an indirect calorimetry approach. Interestingly, whereas the LS mice's locomotor activity was not enhanced (Fig. 7C) and the respiratory quotient (RQ) was similar in both genotypes (Fig. 7D), EE was significantly increased in LS mice compared with their control littermates, both under ND and HFD (Fig. 7E). Equivalent RQ excluded major change in the fuel-partitioning patterns, suggesting that increased EE resulted from higher catabolism of both carbohydrates and lipids

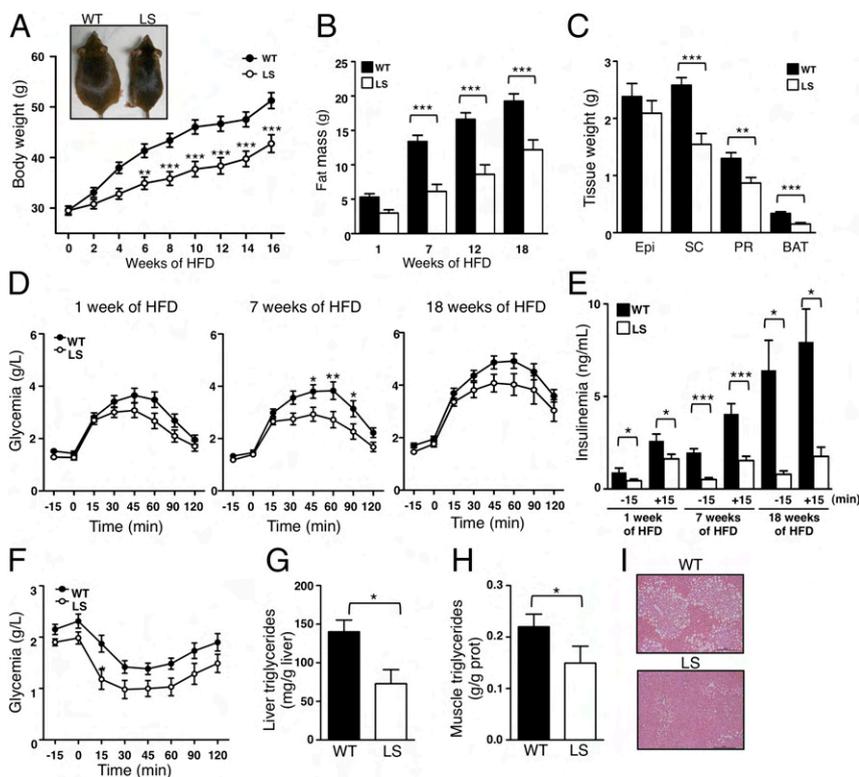


Fig. 6. LS mice are resistant to HFD-induced obesity and seem protected from obesity-associated gluco-intolerance, insulin resistance and ectopic lipid deposits. (A–F) WT ($n = 14$) and LS ($n = 13$) animals were fed a HFD, and analyses were performed as in Fig. 1 C–E and 4 A–C. (G and H) At 30 wk of age, liver (G) and gastrocnemius muscle (H) from WT and LS animals were withdrawn and triglycerides content was determined ($*P < 0.05$, Mann–Whitney nonparametric test). (I) Representative pictures of H&E liver sections.

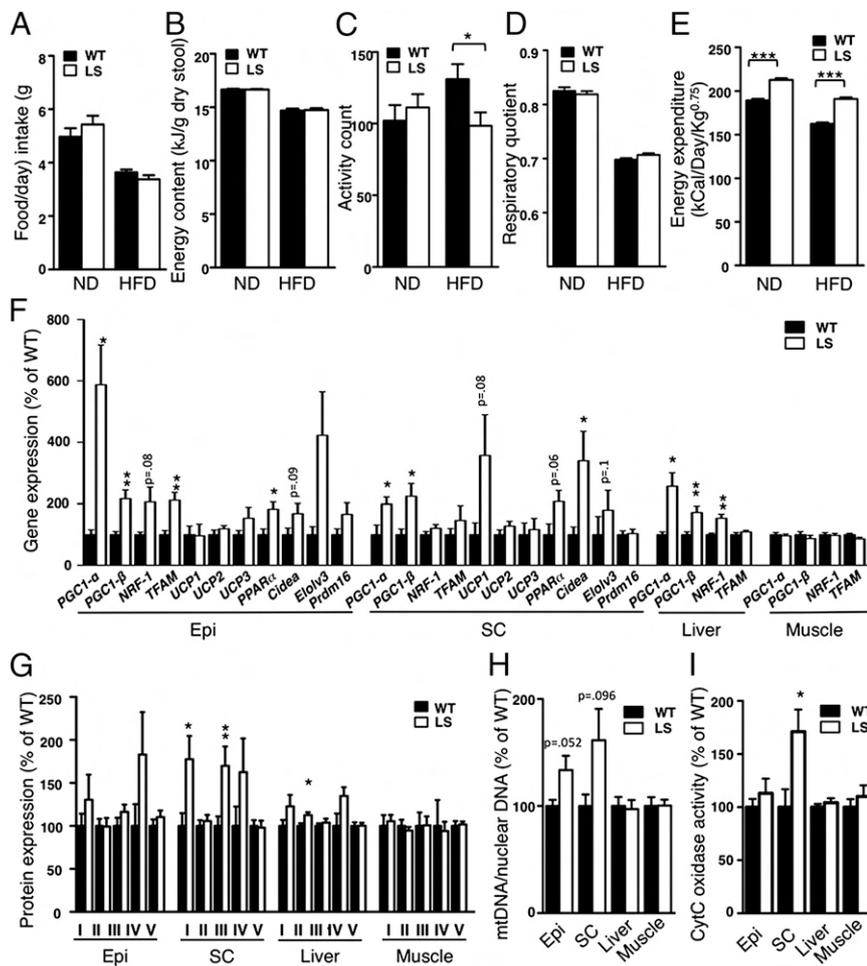


Fig. 7. Increased energy expenditure in LS animals. (A) Twenty-week-old WT and LS mice maintained under ND (7 WT, 12 LS) or HFD (7 WT, 6 LS) were placed in individual cages, then food pellets were regularly weighed to determine food intake (nonsignificant, unpaired two-tailed Student *t* test). (B) WT and LS mice maintained under ND (8 WT, 12 LS) or HFD (9 WT, 7 LS) were placed in individual cages for 3 d, then stool were collected, dried, and energy content was determined by using a bomb calorimeter (nonsignificant, unpaired two-tailed Student *t* test). (C–E) Sixteen- to 18-wk-old WT and LS animals maintained under ND (6 WT, 6 LS) or HFD (7 WT, 6 LS) were placed in individual chambers. After 24 h of acclimatization, they were subjected to indirect calorimetry analysis for 24 h. Activity (C), respiratory quotient (D) and energy expenditure (E) were determined (**P* < 0.05; ****P* < 0.001, two-way ANOVA with repeated measures). (F–I) Adipose tissues, liver, and muscle samples from 30-wk-old WT and LS mice (8 WT, 8 LS) were processed for real-time PCR analysis to determine expression of the indicated genes (F), for Western blot analysis to assess expression of respiratory chain complexes I to V (G), for determination of mitochondrial DNA content (H) and for cytochrome C activity from tissues homogenates (I) (**P* < 0.05; ***P* < 0.01, unpaired two-tailed Student *t* test).

in LS animals. Thus, these results infer that decreased body weight and adiposity in LS mice can be due to increased metabolic rate.

To get insights into the origin of increased EE, we then analyzed the expression pattern of a series of genes involved in mitochondria biogenesis and function. Interestingly, both *PGC-1 α* and β were overexpressed in epididymal and s.c. adipose tissues from LS mice fed a ND (Fig. 7F), and *PGC-1 α* overexpression was found in all fat pads tested (Fig. S7B). Moreover, expression of two *PGC-1*-target genes involved in mitochondriogenesis, *TFAM* and *NRF-1*, was also increased in epididymal adipose tissue, whereas the expression of *UCP1* gene was augmented in s.c. adipose tissue from LS mice. Importantly, expression of several markers of adipose tissue “being” (*PPAR α* , *Cidea*, *Elovl3*) was enhanced in adipose tissues from LS mice. Of note, up-regulation of *PGC-1 α* , *PGC-1 β* and *NRF-1* was also found in liver from LS mice compared with WT animals, whereas we did not observe any change in muscle (Fig. 7F). In line with a possible increase in mitochondria amount and/or function, Western blot analysis of mitochondrial complexes revealed a slight up-regulation of several of these proteins in tissues from LS mice, notably in adipose tissues and liver (Fig. 7G). Moreover, quantification of mitochondrial DNA revealed an upward trend for mitochondria density in epididymal and s.c. adipose tissues (Fig. 7H) and assessment of cytochrome C (cytC) oxidase activity in tissue homogenates showed a significant increase of cytC oxidase activity in s.c. adipose tissue (Fig. 7I). Altogether, this set of results suggests that LS condition can be associated with improved mitochondria biogenesis and/or activity, possibly through *PGC-1* up-regulation, which could explain, in part, increased energy expenditure.

LS Patients May Also Display a Lean Phenotype. Finally, we started to evaluate whether leanness and reduced adiposity found in LS mice were also a phenotypic trait of patients with LS. Clinical data were available in 28 patients with LS, genetically confirmed with a mutation in the *PTPN11* (*n* = 27) or *RAF1* (*n* = 1) genes. Most of LS patients (20 of 28 patients; 71%) had body mass index (BMI) *z* score in the lower normal range with a median *z* score of -0.6 (range -1.5 – 1.2) (Fig. 8A). This distribution was similar whatever the *PTPN11* mutations, indicating no obvious genotype/phenotype correlation, although the groups were too small to draw definite conclusions (Fig. 8B). Moreover, for two of these patients (BMI *z* score of -0.9 and -0.8 , respectively), dual-energy X-ray absorptiometry (DXA) analysis and biochemical measurements were available. Interestingly, these case reports revealed that both patients had reduced adiposity with a percentage of fat body mass *z* score of -2.4 and -1.8 (Table 2). Consistent with this finding, both patients displayed very low levels of plasma leptin, highlighting that their reduced adiposity may have functional consequences. Thus, although preliminary, these results strongly suggest that LS condition can be associated with a lean phenotype in humans.

Discussion

In this study, we designed a mouse model carrying one mutated allele of the *Ptpn11* gene encoding the T468M mutant of SHP2 to explore the metabolic consequences of LS-associated SHP2 mutations. Extensive phenotyping of this LS mouse strain revealed that, in addition to the expected and previously observed symptoms (13, 19), LS animals exhibit markedly reduced adiposity and overall better metabolic profile, resulting in a lean and DIO resistance phenotype. Importantly, preliminary data obtained in a French

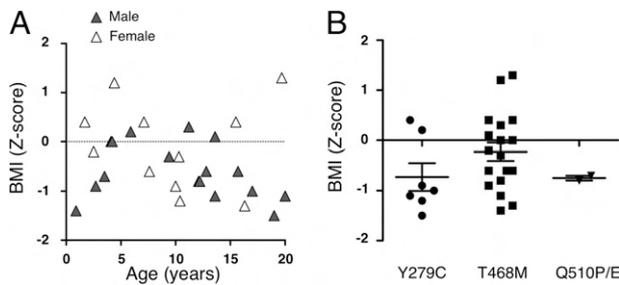


Fig. 8. Most LS patients display lower-than-average BMI. (A) BMI z score of female and male LS patients were plotted against age. (B) BMI z score of LS patients were plotted against *PTPN11* mutations.

cohort of LS patients suggest that such metabolic modifications could be found in humans; indeed, most of them display a lower-than-average BMI, which correlates, for the few patients we could test, with reduced adiposity. Altogether, our study demonstrates, for the first time to our knowledge, that LS condition can be associated with a metabolic benefit.

Beyond LS pathophysiology, our findings also highlight a key role for SHP2 in the regulation of whole body energy homeostasis. Interestingly, the positive metabolic outcomes of general expression of a LS mutant of SHP2 appear to be at odds with the few models of systemic inhibition of SHP2 function described so far. Indeed, half reduction of SHP2 expression in *SHP2^{+/-}* mice had no impact on body weight and glucose metabolism, whereas overexpression of a dominant negative mutant in transgenic mice gave rise to glucose intolerance and insulin insensitivity (20, 21). Noticeably, none of these models has been reported to develop the clinical traits of LS. These apparent discrepancies could probably be explained by the respective amount of functional SHP2 that can be recruited to signaling complexes and transduce information. Moreover, this difference also suggests that LS mutations do not simply result in a loss-of-function effect. Indeed, it might well be that LS mutants can retain some docking, phosphatase-independent activity or could have some substrate trapping effect (16, 17).

We got first molecular insights into how LS-associated SHP2 T468M mutant can drive a lean phenotype. Indeed, we determined that expression of LS-associated SHP2 mutants in vivo and in vitro resulted in hyperactivation of both PI3K/Akt and MAPK in several metabolic tissues in response to insulin. In contrast to LS-associated PI3K/Akt hyperactivation, which has been observed in several models (13, 19), LS mutant-induced MAPK hyperactivation is more controversial. Indeed, in heart from *Ptpn11^{Y279C/+}* mice, MAPK ERK1/2 phosphorylation was strongly reduced in response to several agonists, including insulin (13), a feature that was also found in the *Ptpn11^{T468M/+}* mice. However, expression of LS mutants promoted MAPK hyperactivation in other biological models and in vitro, notably under basal and low stimulation conditions (14–16). One can thus imagine that LS mutants differently affect ERK1/2-regulating mechanisms depending on the cell type and on the signal nature and strength. Importantly, we provide some evidences that LS-associated leanness can be due, at least in part, to MAPK up-regulation, because chronic MEK inhibition partially reverted the lean phenotype of LS mice. In contrast, chronic treatment with rapamycin did not affect body weight and adiposity of LS mice, but strongly impaired their glucose tolerance. Interestingly, PI3K/Akt/mTOR hyperactivation has also been reported in other LS mouse models, notably in cardiac tissue following insulin injection, and has been involved in LS-associated cardiac defects (13, 19). Altogether, our results suggest that combined dysregulation of the Ras/MAPK and PI3K/Akt/mTOR pathways may participate to the lean phenotype of the LS mice. Moreover, dysregulation of additional signaling cues could certainly participate in the implementation of the metabolic phenotype in LS mice.

Going into details about the metabolic consequences of LS mutation, the most prominent feature of LS mice is their strong reduction in adiposity and their DIO resistance phenotype, which can be the resultant of several dysfunctions. First, we have shown that LS-causing mutation reduces the differentiation of SVF-derived cells into adipocytes, suggesting a defect in adipogenesis. Supporting this view, aP2-Cre-mediated *Ptpn11* invalidation in adipose tissue strongly impairs adipose tissue development, and SHP2 knockdown in a preadipocyte cell line or in pluripotent embryonic stem cells strongly inhibited adipocyte differentiation (29, 30). Defective adipogenesis could result from dysregulation of specific signaling pathways in adipocyte precursors, notably p38, as proposed by He et al. (30) or MAPK ERK1/2 (32), but also from inappropriate production of adipogenesis-regulating factors. Of note, more general determination processes might be impaired in LS mice, because SHP2 has been shown to control stem cell development (33, 34). Besides an adipogenesis defect, reduced fat mass can arise from enhanced lipolysis activity. However, the precise mechanisms that stimulate lipolysis in LS adipocytes remain to be established. Interestingly, one may hypothesize that the observed enhanced insulin-evoked MAPK activation in LS adipose tissue can sustain lipolysis, because MAPK can down-regulate perilipin and activate HSL (35, 36). Second, beyond an intrinsic effect on adipose tissue maintenance, reduced adiposity and DIO resistance of LS mice is also certainly due, at least in part, to their increased energy expenditure. Interestingly, hepatic inactivation of SHP2 (LSHKO mice) also resulted in resistance to HFD-induced obesity and increased energy expenditure (28), suggesting that reduced SHP2 activity in the liver of LS mice participates in their DIO resistance. However, because LSHKO mice have normal body weight under ND, increased energy expenditure in other organs, notably adipose tissue, may contribute to LS mice leanness (25). Supporting this view, we found that the key enhancers of mitochondriogenesis and energy metabolism *PGC-1* were overexpressed in both liver and adipose tissue of LS mice, and that mitochondrial density and cytochrome C oxidase activity were increased in some fat pads. In addition, we could determine that some markers of adipose tissue being were up-regulated in adipose tissues from LS mice, notably in s.c. fat pads, suggesting that this adipose tissue has enhanced oxidative activity, which could contribute to enhanced energy expenditure. Interestingly, several studies have shown that SHP2 could regulate mitochondria activity, although the signaling pathways that link SHP2, and its LS-associated mutants, to the regulation of mitochondria function and energy homeostasis remain to be documented (37–42).

Our study also highlights that T468M SHP2 mutant expression gives rise to overall better metabolic status. Indeed, LS mice display normal plasma lipid profile, under ND and HFD conditions, with only a slight reduction of cholesterol level when fed a HFD. Moreover, ectopic lipid deposits in liver and muscle were

Table 2. Case report: Clinical data from 2 LS patients (age- and sex-adapted normal range)

Clinical data	Patient 1	Patient 2
Mutation	c.1403C > T (T468M)	c.836A > G (Y279C)
Age	7	10
Sex	Female	Female
Weight, kg	18	22.8
Weight, SD	-1.00	-3.00
Height, m	1.14	1.24
Height, SD	-1.00	-2.10
BMI, kg/m ²	13.9	14.9
BMI, SD	-0.9	-0.8
% fat mass, SD	-2.4	-1.8
Leptin, mg/L	2.8 (3.7–11.1)	2.9 (3.7–11.1)

Standard deviation (SD) and normal range for leptin concentration, indicated with parentheses, are age and sex adapted.

significantly reduced in LS mice, even when fed a HFD, suggesting an improved lipid metabolism for LS mice despite reduced adiposity. Interestingly, LSHKO mice fed a HFD were also found with decreased hepatic lipid storage and serum triglycerides, suggesting that SHP2 partial inactivation in the liver of LS mice participates to this phenotype (28). Importantly, LS mice were also found with improved carbohydrates metabolism. Although reduced adiposity in LS mice may contribute to their better insulin sensitivity, our *in vitro* results show that expression of LS mutants is sufficient to enhance insulin signaling. Moreover, LSHKO mice also display improved glucose tolerance and insulin sensitivity, under HFD and in normal chow conditions (25, 28), suggesting that improvement of glucose metabolism in LS mice could be due to an effect of LS mutant at the hepatic level. It is also important to note that insulin levels in LS mice remained low, albeit glucose-inducible, even in aged or HFD-fed mice. Although this feature could be linked to their enhanced insulin sensitivity, expression of LS-associated SHP2 mutant in the pancreas may also inhibit insulin secretion, because it has been shown that SHP2 deletion in the pancreas strongly reduces glucose-induced insulin secretion (27).

Importantly, the lean phenotype of the LS mice appears to be at variance with several models of tissue-specific SHP2 knockouts. Indeed, SHP2 invalidation in muscle results in insulin insensitivity and glucose intolerance, with triglycerides accumulation in the muscle (26), whereas the opposite phenotype is observed in LS mice. Moreover, in contrast to LS mice that display reduced adiposity and DIO resistance, mice lacking SHP2 at the neuronal level have been shown to develop obesity and/or diabetes. Interestingly, these opposite features appear to be related to leptin signaling, because neuronal SHP2 knockout is associated with hyperleptinemia and leptin resistance (22–24), whereas LS mice display no sign of leptin resistance and low leptin level. Regarding this latter low leptinemia, it may contribute to the reduced blood pressure observed in the LS mice, because it has been demonstrated by He et al. that reduced adiposity and leptin level were causally linked to hypotension in an adipose tissue-specific SHP2 KO mouse model (30).

Altogether, these data reveal that the metabolic phenotype of LS mice is not simply the sum of the different tissue-specific models of SHP2 invalidation. A molecular explanation for this difference could be that heterozygous expression of the T468M mutant of SHP2 induces both PI3K and MAPK hyperactivation in metabolic tissues, notably in response to insulin, whereas SHP2 invalidation has different impact on these signaling pathways depending on the targeted tissue. Thus, LS mice resemble LSHKO mice, in which a strong PI3K up-regulation has been observed in the liver (25, 28), but differ from models of tissues specific to SHP2 inactivation that mainly results in MAPK inhibition (muscle, brain) (23, 26). However, because LS mutant can also inhibit the MAPK pathway, notably in cardiac tissue (13), detailed analysis of activation levels of those particular signaling pathways, in different tissues and in response to various agonists, will be necessary to validate this concept.

The identification of a lean phenotype in the LS mouse model also raises several questions in pathophysiology. First, does this apparent metabolic benefit participate in some symptoms of the disease? For instance, it is well established that an imbalance in metabolic substrate utilization, and altered response to insulin and key cardiac function regulating adipokines (e.g., leptin, adiponectin), can participate in the development of HCM, the most frequent LS-associated cardiopathy (43, 44). Therefore, it would be worthwhile to complete and extend to additional cases the metabolic exploration of LS patients, and to correlate their metabolic status to the development of other symptoms of the disease. Second, is this metabolic advantage a characteristic of SHP2 mutation-driven LS or a common feature of Rasopathies? That MAPK hyperactivation can be a cause of the lean phenotype of LS mice argues in favor of the latter. Noticeably, recent surveys have reported that patients with Rasopathies, notably with Noonan syndrome, rarely develop into being overweight or obese (45, 46). Interestingly, Wu et al. (47) have shown that

PD0325901-mediated MAPK inhibition in a mouse model of Noonan syndrome caused significant increase in body weight and adiposity, suggesting a protective role of MAPK hyperactivation toward the development of obesity. Therefore, it might be important to generalize metabolic exploration to other Rasopathies. Last but not least, because heterozygous expression of an LS mutant of SHP2 enhances energetic metabolism and has a protective effect toward obesity and diabetes, one may wonder whether equivalent pharmacological modulation of SHP2, that functionally mimics LS mutations, could be a potent strategy to alleviate obesity and associated pathologies. Indeed, it has been shown that SHP2 expression is up-regulated in metabolic tissues from obese animals, suggesting that increased SHP2 expression/activity contributes to the development of obesity (28, 31, 48, 49). Further studies are definitely warranted to address these burning questions.

Materials and Methods

Mouse Studies. All procedures were performed in accordance with institutional guidelines for animal research and were approved by the Animal Care and Use Committee of Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U5006. For all *in vivo* studies, male mice *Ptpn11*^{T468M/+} and their *Ptpn11*^{+/+} littermates have been compared. For reversion experiments, animals were injected *i.p.* with 1 mg·kg⁻¹·d⁻¹ PD0325901, 2 mg·kg⁻¹·d⁻¹ rapamycin or vehicle as a control for 1 mo. EchoMRI analyses (Echo Medical Systems) were performed by following manufacturer's instructions to determine body composition. For OGTT and ITT, after 6-h fasting, mice were fed with glucose (3 g/kg) for OGTT or injected with insulin (0.5 units/kg) for ITT, then blood was taken from the tail vein and glucose levels were monitored over time by using a glucometer (Accu-check; Roche Diagnostics) or using Glucose RTU kit (bioMérieux). Indirect calorimetry was performed at the indicated age after 24 h of acclimatization in individual cages. O₂ consumption (VO₂) and CO₂ production (VCO₂) were measured (Oxylet; Panlab-Bioseb) in individual mice at 25-min intervals during a 24-h period. The respiratory quotient (RQ = VCO₂/VO₂) and energy expenditure (in kcal·d⁻¹·kg⁻¹, 0.75 = 1.44 × VO₂ × [3.815 + 1.232 × RQ]) were calculated. Ambulatory activities of the mice were monitored by an infrared photocell beam interruption method (Sedacom; Panlab-Bioseb).

Lentiviral Transduction and Insulin Stimulation of Mouse Embryonic Fibroblasts. Previously described cDNA encoding V5-SHP2-WT, T468M, and -Y279C (18) were made shRNA-resistant by generating silent mutations through site-directed mutagenesis, then subcloned into the previously described pLVTHM/sh-SHP2 in lieu of the GFP cassette (50). Lentivectors were generated as described in ref. 50 and used to transduce immortalized MEFs. Cells were seeded in 60-mm dishes, serum deprived, then stimulated or not with 50 nM insulin for 5 min, rinsed with ice cold PBS, lysed in Laemmli's sample buffer, and processed for Western blot analysis.

Clinical Data Collection and Analysis. The data collection and exploration of genes for LS patients was performed in the Department of Genetics, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris-Robert Debré Hospital, Paris, and was approved by Institutional Review Boards (Program Hospitalier de Recherche Clinique National, AOM02004). Written informed consent was obtained from the legal guardians and/or patients. Auxological data (height and weight) were available in 28 patients (11 females, 17 males, age range 0–20 y old). BMI was calculated as the ratio of weight in kilograms divided by the square of height in meters, and BMI measurements were converted to age- and sex-specific z scores on the basis of French reference data (51). Fat body mass was measured by dual-energy X-ray absorptiometry (DXA) analysis by using a Lunar Prodigy device (GE Healthcare), expressed as a percentage of total body mass and transformed to age-specific z scores (52).

Statistics. All data are expressed as mean ± SEM. Except otherwise indicated, statistical significance was determined by using paired or unpaired two-tailed Student *t* test, with Welch correction in case of unequal variances, two-way ANOVA with Bonferroni post hoc test, or two-way ANOVA with repeated measures, as appropriate. *P* values <0.05 were considered significant (**P* < 0.05; ***P* < 0.01; ****P* < 0.001).

ACKNOWLEDGMENTS. We thank the Mouse Clinical Institute for generation of the *Ptpn11*^{T468M/+} mice; the personnel of the Anexplo animal facilities for animal handling; the Phenotyping platform and the Non-Invasive Exploration service -U5006/Centre Régional d'Exploration Fonctionnelle et de

Ressources Expérimentales Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM)/Université Paul Sabatier; the histology facility of Unité Mixte de Recherche U1048; all past and present members of the Adipolab for technical and scientific support; Drs. C. Dray, J.-S. Saulnier-Blache, I. Castan-Laurell, C. Bertrand, and C. Rancoule for fruitful discussions and technical assistance; and L. Casteilla, A. Galinier, A. Carrière, and D. Langin

for invaluable advice. This work was supported by grants from INSERM, Ministère de l'Éducation Nationale de la Recherche et de la Technologie (France), Groupement d'Intérêt Scientifique-Maladies Rares, Agence Nationale de la Recherche, e-Rare (European Network on Noonan syndrome and related disorders, NSEuroNet), Institut National du Cancer and Direction de l'Hospitalisation et de l'Offre de Soins/INSERM.

- Tartaglia M, Gelb BD, Zenker M (2011) Noonan syndrome and clinically related disorders. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 25(1):161–179.
- Keren B, et al.; French Collaborative Noonan Study Group (2004) PTPN11 mutations in patients with LEOPARD syndrome: A French multicentric experience. *J Med Genet* 41(11):e117.
- Grossmann KS, Rosário M, Birchmeier C, Birchmeier W (2010) The tyrosine phosphatase Shp2 in development and cancer. *Adv Cancer Res* 106:53–89.
- Zhang SQ, et al. (2002) Receptor-specific regulation of phosphatidylinositol 3'-kinase activation by the protein tyrosine phosphatase Shp2. *Mol Cell Biol* 22(12):4062–4072.
- Zhang SQ, et al. (2004) Shp2 regulates SRC family kinase activity and Ras/Erk activation by controlling Csk recruitment. *Mol Cell* 13(3):341–355.
- Chen Y, et al. (2003) Identification of Shp-2 as a Stat5A phosphatase. *J Biol Chem* 278(19):16520–16527.
- Dance M, Montagner A, Salles JP, Yart A, Raynal P (2008) The molecular functions of Shp2 in the Ras/Mitogen-activated protein kinase (ERK1/2) pathway. *Cell Signal* 20(3):453–459.
- Zito CI, Qin H, Blenis J, Bennett AM (2007) SHP-2 regulates cell growth by controlling the mTOR/S6 kinase 1 pathway. *J Biol Chem* 282(10):6946–6953.
- Kontaridis MI, et al. (2004) SHP-2 positively regulates myogenesis by coupling to the Rho GTPase signaling pathway. *Mol Cell Biol* 24(12):5340–5352.
- Hanna N, et al. (2006) Reduced phosphatase activity of SHP-2 in LEOPARD syndrome: Consequences for PI3K binding on Gab1. *FEBS Lett* 580(10):2477–2482.
- Tartaglia M, et al. (2006) Diversity and functional consequences of germline and somatic PTPN11 mutations in human disease. *Am J Hum Genet* 78(2):279–290.
- Kontaridis MI, Swanson KD, David FS, Barford D, Neel BG (2006) PTPN11 (Shp2) mutations in LEOPARD syndrome have dominant negative, not activating, effects. *J Biol Chem* 281(10):6785–6792.
- Marin TM, et al. (2011) Rapamycin reverses hypertrophic cardiomyopathy in a mouse model of LEOPARD syndrome-associated PTPN11 mutation. *J Clin Invest* 121(3):1026–1043.
- Oishi K, et al. (2009) Phosphatase-defective LEOPARD syndrome mutations in PTPN11 gene have gain-of-function effects during Drosophila development. *Hum Mol Genet* 18(1):193–201.
- Carvajal-Vergara X, et al. (2010) Patient-specific induced pluripotent stem-cell-derived models of LEOPARD syndrome. *Nature* 465(7299):808–812.
- Yu ZH, et al. (2013) Structural and mechanistic insights into LEOPARD syndrome-associated SHP2 mutations. *J Biol Chem* 288(15):10472–10482.
- Stewart RA, et al. (2010) Phosphatase-dependent and -independent functions of Shp2 in neural crest cells underlie LEOPARD syndrome pathogenesis. *Dev Cell* 18(5):750–762.
- Edouard T, et al. (2010) Functional effects of PTPN11 (SHP2) mutations causing LEOPARD syndrome on epidermal growth factor-induced phosphoinositide 3-kinase/AKT/glycogen synthase kinase 3 β signaling. *Mol Cell Biol* 30(10):2498–2507.
- Schramm C, Fine DM, Edwards MA, Reeb AN, Krenz M (2012) The PTPN11 loss-of-function mutation Q510E-Shp2 causes hypertrophic cardiomyopathy by dysregulating mTOR signaling. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 302(1):H231–H243.
- Arrandale JM, et al. (1996) Insulin signaling in mice expressing reduced levels of Syp. *J Biol Chem* 271(35):21353–21358.
- Maegawa H, et al. (1999) Expression of a dominant negative SHP-2 in transgenic mice induces insulin resistance. *J Biol Chem* 274(42):30236–30243.
- Zhang EE, Chapeau E, Hagihara K, Feng GS (2004) Neuronal Shp2 tyrosine phosphatase controls energy balance and metabolism. *Proc Natl Acad Sci USA* 101(45):16064–16069.
- Krajewska M, et al. (2008) Development of diabetes in mice with neuronal deletion of Shp2 tyrosine phosphatase. *Am J Pathol* 172(5):1312–1324.
- Banno R, et al. (2010) PTP1B and SHP2 in POMC neurons reciprocally regulate energy balance in mice. *J Clin Invest* 120(3):720–734.
- Matsuo K, et al. (2010) Altered glucose homeostasis in mice with liver-specific deletion of Src homology phosphatase 2. *J Biol Chem* 285(51):39750–39758.
- Princen F, et al. (2009) Deletion of Shp2 tyrosine phosphatase in muscle leads to dilated cardiomyopathy, insulin resistance, and premature death. *Mol Cell Biol* 29(2):378–388.
- Zhang SS, et al. (2009) Coordinated regulation by Shp2 tyrosine phosphatase of signaling events controlling insulin biosynthesis in pancreatic beta-cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 106(18):7531–7536.
- Nagata N, et al. (2012) Hepatic Src homology phosphatase 2 regulates energy balance in mice. *Endocrinology* 153(7):3158–3169.
- Uehara T, et al. (2007) SHP-2 positively regulates adipogenic differentiation in 3T3-L1 cells. *Int J Mol Med* 19(6):895–900.
- He Z, et al. (2013) Nonreceptor tyrosine phosphatase Shp2 promotes adipogenesis through inhibition of p38 MAP kinase. *Proc Natl Acad Sci USA* 110(1):E79–E88.
- Bettaieb A, et al. (2011) Adipose-specific deletion of Src homology phosphatase 2 does not significantly alter systemic glucose homeostasis. *Metabolism* 60(8):1193–1201.
- Gehart H, Kumpf S, Iltner A, Ricci R (2010) MAPK signalling in cellular metabolism: Stress or wellness? *EMBO Rep* 11(11):834–840.
- Wu D, et al. (2009) A conserved mechanism for control of human and mouse embryonic stem cell pluripotency and differentiation by shp2 tyrosine phosphatase. *PLoS ONE* 4(3):e4914.
- Feng GS (2007) Shp2-mediated molecular signaling in control of embryonic stem cell self-renewal and differentiation. *Cell Res* 17(1):37–41.
- Liu LR, et al. (2011) Serum amyloid A induces lipolysis by downregulating perilipin through ERK1/2 and PKA signaling pathways. *Obesity (Silver Spring)* 19(12):2301–2309.
- Greenberg AS, et al. (2001) Stimulation of lipolysis and hormone-sensitive lipase via the extracellular signal-regulated kinase pathway. *J Biol Chem* 276(48):45456–45461.
- Salvi M, et al. (2004) Tyrosine phosphatase activity in mitochondria: Presence of Shp-2 phosphatase in mitochondria. *Cell Mol Life Sci* 61(18):2393–2404.
- Arachiche A, et al. (2008) Localization of PTP-1B, SHP-2, and Src exclusively in rat brain mitochondria and functional consequences. *J Biol Chem* 283(36):24406–24411.
- Duarte A, et al. (2012) Mitochondrial fusion is essential for steroid biosynthesis. *PLoS ONE* 7(9):e45829.
- Lee I, et al. (2010) A suggested role for mitochondria in Noonan syndrome. *Biochim Biophys Acta* 1802(2):275–283.
- Xu D, Zheng H, Yu WM, Qu CK (2013) Activating mutations in protein tyrosine phosphatase Ptpn11 (Shp2) enhance reactive oxygen species production that contributes to myeloproliferative disorder. *PLoS ONE* 8(5):e63152.
- Zheng H, Li S, Hsu P, Qu CK (2013) Induction of a tumor-associated activating mutation in protein tyrosine phosphatase Ptpn11 (Shp2) enhances mitochondrial metabolism, leading to oxidative stress and senescence. *J Biol Chem* 288(36):25727–25738.
- Cornier MA, Marshall JA, Hill JO, Maahs DM, Eckel RH (2011) Prevention of overweight/obesity as a strategy to optimize cardiovascular health. *Circulation* 124(7):840–850.
- Abel ED, Litwin SE, Sweeney G (2008) Cardiac remodeling in obesity. *Physiol Rev* 88(2):389–419.
- Binder G, et al. (2012) Health and quality of life in adults with Noonan syndrome. *J Pediatr* 161(3):501–505, e1.
- Malaquias AC, et al. (2012) Growth standards of patients with Noonan and Noonan-like syndromes with mutations in the RAS/MAPK pathway. *Am J Med Genet A* 158A(11):2700–2706.
- Wu X, et al. (2011) MEK-ERK pathway modulation ameliorates disease phenotypes in a mouse model of Noonan syndrome associated with the Raf1(L613V) mutation. *J Clin Invest* 121(3):1009–1025.
- Tagami S, et al. (2002) Troglitazone ameliorates abnormal activity of protein tyrosine phosphatase in adipose tissues of Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty rats. *Tohoku J Exp Med* 197(3):169–181.
- Ahmad F, Goldstein BJ (1995) Alterations in specific protein-tyrosine phosphatases accompany insulin resistance of streptozotocin diabetes. *Am J Physiol* 268(5 Pt 1):E932–E940.
- De Rocca Serra-Nédélec A, et al. (2012) Noonan syndrome-causing SHP2 mutants inhibit insulin-like growth factor 1 release via growth hormone-induced ERK hyperactivation, which contributes to short stature. *Proc Natl Acad Sci USA* 109(11):4257–4262.
- Rolland-Cachera MF, et al. (1991) Body Mass Index variations: Centiles from birth to 87 years. *Eur J Clin Nutr* 45(1):13–21.
- van der Sluis IM, de Ridder MA, Boot AM, Krenning EP, de Muinck Keizer-Schrama SM (2002) Reference data for bone density and body composition measured with dual energy x ray absorptiometry in white children and young adults. *Arch Dis Child* 87(4):341–347, discussion 341–347.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] Critchley, "The neurology of old age," *The Lancet*, pp. 1119–1127., 1931.
- [2] J. E. Morley, R. N. Baumgartner, R. Roubenoff, J. Mayer, and K. S. Nair, "Sarcopenia," *J. Lab. Clin. Med.*, vol. 137, no. 4, pp. 231–243, Apr. 2001.
- [3] A. J. Cruz-Jentoft, J. P. Baeyens, J. M. Bauer, Y. Boirie, T. Cederholm, F. Landi, F. C. Martin, J.-P. Michel, Y. Rolland, S. M. Schneider, E. Topinková, M. Vandewoude, M. Zamboni, and European Working Group on Sarcopenia in Older People, "Sarcopenia: European consensus on definition and diagnosis: Report of the European Working Group on Sarcopenia in Older People," *Age Ageing*, vol. 39, no. 4, pp. 412–423, Jul. 2010.
- [4] M. G. M. Olde Rikkert, A. S. Rigaud, R. J. van Hoeyweghen, and J. de Graaf, "Geriatric syndromes: medical misnomer or progress in geriatrics?," *Neth. J. Med.*, vol. 61, no. 3, pp. 83–87, Mar. 2003.
- [5] A. J. Cruz-Jentoft, F. Landi, E. Topinková, and J.-P. Michel, "Understanding sarcopenia as a geriatric syndrome," *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care*, vol. 13, no. 1, pp. 1–7, Jan. 2010.
- [6] J. E. Morley, A. M. Abbatecola, J. M. Argiles, V. Baracos, J. Bauer, S. Bhasin, T. Cederholm, A. J. S. Coats, S. R. Cummings, W. J. Evans, K. Fearon, L. Ferrucci, R. A. Fielding, J. M. Guralnik, T. B. Harris, A. Inui, K. Kalantar-Zadeh, B.-A. Kirwan, G. Mantovani, M. Muscaritoli, A. B. Newman, F. Rossi-Fanelli, G. M. C. Rosano, R. Roubenoff, M. Schambelan, G. H. Sokol, T. W. Storer, B. Vellas, S. von Haehling, S.-S. Yeh, S. D. Anker, and Society on Sarcopenia, Cachexia and Wasting Disorders Trialist Workshop, "Sarcopenia with limited mobility: an international consensus," *J. Am. Med. Dir. Assoc.*, vol. 12, no. 6, pp. 403–409, Jul. 2011.
- [7] S. A. Studenski, K. W. Peters, D. E. Alley, P. M. Cawthon, R. R. McLean, T. B. Harris, L. Ferrucci, J. M. Guralnik, M. S. Fragala, A. M. Kenny, D. P. Kiel, S. B. Kritchevsky, M. D. Shardell, T.-T. L. Dam, and M. T. Vassileva, "The FNIH sarcopenia project: rationale, study description, conference recommendations, and final estimates," *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.*, vol. 69, no. 5, pp. 547–558, May 2014.
- [8] M.-Y. Chien, T.-Y. Huang, and Y.-T. Wu, "Prevalence of sarcopenia estimated using a bioelectrical impedance analysis prediction equation in community-dwelling elderly people in Taiwan," *J. Am. Geriatr. Soc.*, vol. 56, no. 9, pp. 1710–1715, Sep. 2008.
- [9] I. Janssen, S. B. Heymsfield, R. N. Baumgartner, and R. Ross, "Estimation of skeletal muscle mass by bioelectrical impedance analysis," *J. Appl. Physiol. Bethesda Md 1985*, vol. 89, no. 2, pp. 465–471, Aug. 2000.
- [10] R. N. Pierson, J. Wang, J. C. Thornton, T. B. Van Itallie, and E. W. Colt, "Body potassium by four-pi 40K counting: an anthropometric correction," *Am. J. Physiol.*, vol. 246, no. 2 Pt 2, pp. F234–239, Feb. 1984.
- [11] L. Wielopolski, L. M. Ramirez, D. Gallagher, S. R. Sarkar, F. Zhu, G. A. Kaysen, N. W. Levin, S. B. Heymsfield, and Z. M. Wang, "Measuring partial body potassium in the arm versus total body potassium," *J. Appl. Physiol. Bethesda Md 1985*, vol. 101, no. 3, pp. 945–949, Sep. 2006.
- [12] M. Wyss and R. Kaddurah-Daouk, "Creatine and creatinine metabolism," *Physiol. Rev.*, vol. 80, no. 3, pp. 1107–1213, Jul. 2000.
- [13] S. A. Stimpson, S. M. Turner, L. G. Clifton, J. C. Poole, H. A. Mohammed, T. W. Shearer, G. M. Waitt, L. L. Hagerty, K. S. Remlinger, M. K. Hellerstein, and W. J. Evans, "Total-body creatine pool size and skeletal muscle mass determination by creatine-(methyl-D3) dilution in rats," *J. Appl. Physiol. Bethesda Md 1985*, vol. 112, no. 11, pp. 1940–1948, Jun. 2012.
- [14] R. V. Clark, A. C. Walker, R. L. O'Connor-Semmes, M. S. Leonard, R. R. Miller, S. A. Stimpson, S. M. Turner, E. Ravussin, W. T. Cefalu, M. K. Hellerstein, and W. J. Evans, "Total body skeletal muscle mass: estimation by creatine (methyl-d3) dilution in humans," *J. Appl. Physiol. Bethesda Md 1985*, vol. 116, no. 12, pp. 1605–1613, Jun. 2014.
- [15] F. Lauretani, C. R. Russo, S. Bandinelli, B. Bartali, C. Cavazzini, A. Di Iorio, A. M. Corsi, T. Rantanen, J. M. Guralnik, and L. Ferrucci, "Age-associated changes in skeletal

- muscles and their effect on mobility: an operational diagnosis of sarcopenia,” *J. Appl. Physiol. Bethesda Md* 1985, vol. 95, no. 5, pp. 1851–1860, Nov. 2003.
- [16] J. M. Guralnik, L. Ferrucci, C. F. Pieper, S. G. Leveille, K. S. Markides, G. V. Ostir, S. Studenski, L. F. Berkman, and R. B. Wallace, “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.*, vol. 55, no. 4, pp. M221–231, Apr. 2000.
- [17] M. Cesari, S. B. Kritchevsky, A. B. Newman, E. M. Simonsick, T. B. Harris, B. W. Penninx, J. S. Brach, F. A. Tykavsky, S. Satterfield, D. C. Bauer, S. M. Rubin, M. Visser, M. Pahor, and Health, Aging and Body Composition Study, “Added value of physical performance measures in predicting adverse health-related events: results from the Health, Aging And Body Composition Study,” *J. Am. Geriatr. Soc.*, vol. 57, no. 2, pp. 251–259, Feb. 2009.
- [18] M. A. Clynes, M. H. Edwards, B. Buehring, E. M. Dennison, N. Binkley, and C. Cooper, “Definitions of Sarcopenia: Associations with Previous Falls and Fracture in a Population Sample,” *Calcif. Tissue Int.*, Jul. 2015.
- [19] S. Mathias, U. S. Nayak, and B. Isaacs, “Balance in elderly patients: the ‘get-up and go’ test,” *Arch. Phys. Med. Rehabil.*, vol. 67, no. 6, pp. 387–389, Jun. 1986.
- [20] C. Beaudart, J. Y. Reginster, J. Petermans, S. Gillain, A. Quabron, M. Locquet, J. Slomian, F. Buckinx, and O. Bruyère, “Quality of life and physical components linked to sarcopenia: The SarcoPhAge study,” *Exp. Gerontol.*, vol. 69, pp. 103–110, Sep. 2015.
- [21] J. F. Bean, D. K. Kiely, S. LaRose, J. Alian, and W. R. Frontera, “Is stair climb power a clinically relevant measure of leg power impairments in at-risk older adults?,” *Arch. Phys. Med. Rehabil.*, vol. 88, no. 5, pp. 604–609, May 2007.
- [22] T.-T. Dam, K. W. Peters, M. Fragala, P. M. Cawthon, T. B. Harris, R. McLean, M. Shardell, D. E. Alley, A. Kenny, L. Ferrucci, J. Guralnik, D. P. Kiel, S. Kritchevsky, M. T. Vassileva, and S. Studenski, “An evidence-based comparison of operational criteria for the presence of sarcopenia,” *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.*, vol. 69, no. 5, pp. 584–590, May 2014.
- [23] L.-K. Chen, L.-K. Liu, J. Woo, P. Assantachai, T.-W. Auyeung, K. S. Bahyah, M.-Y. Chou, L.-Y. Chen, P.-S. Hsu, O. Krairit, J. S. W. Lee, W.-J. Lee, Y. Lee, C.-K. Liang, P. Limpawattana, C.-S. Lin, L.-N. Peng, S. Satake, T. Suzuki, C. W. Won, C.-H. Wu, S.-N. Wu, T. Zhang, P. Zeng, M. Akishita, and H. Arai, “Sarcopenia in Asia: consensus report of the Asian Working Group for Sarcopenia,” *J. Am. Med. Dir. Assoc.*, vol. 15, no. 2, pp. 95–101, Feb. 2014.
- [24] P. Han, L. Kang, Q. Guo, J. Wang, W. Zhang, S. Shen, X. Wang, R. Dong, Y. Ma, Y. Shi, Z. Shi, H. Li, C. Li, Y. Ma, L. Wang, and K. Niu, “Prevalence and Factors Associated With Sarcopenia in Suburb-dwelling Older Chinese Using the Asian Working Group for Sarcopenia Definition,” *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.*, Aug. 2015.
- [25] R. Correa-de-Araujo and E. Hadley, “Skeletal muscle function deficit: a new terminology to embrace the evolving concepts of sarcopenia and age-related muscle dysfunction,” *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.*, vol. 69, no. 5, pp. 591–594, May 2014.
- [26] M. Iannuzzi-Sucich, K. M. Prestwood, and A. M. Kenny, “Prevalence of sarcopenia and predictors of skeletal muscle mass in healthy, older men and women,” *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.*, vol. 57, no. 12, pp. M772–777, Dec. 2002.
- [27] N. M. Wright, N. Papadea, S. Willi, J. D. Veldhuis, J. P. Pandey, L. L. Key, and N. H. Bell, “Demonstration of a lack of racial difference in secretion of growth hormone despite a racial difference in bone mineral density in premenopausal women--a Clinical Research Center study,” *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 81, no. 3, pp. 1023–1026, Mar. 1996.
- [28] M. J. Rennie, R. H. Edwards, D. Halliday, D. E. Matthews, S. L. Wolman, and D. J. Millward, “Muscle protein synthesis measured by stable isotope techniques in man: the effects of feeding and fasting,” *Clin. Sci. Lond. Engl.* 1979, vol. 63, no. 6, pp. 519–523, Dec. 1982.
- [29] S. C. Bodine, T. N. Stitt, M. Gonzalez, W. O. Kline, G. L. Stover, R. Bauerlein, E. Zlotchenko, A. Scrimgeour, J. C. Lawrence, D. J. Glass, and G. D. Yancopoulos,

- "Akt/mTOR pathway is a crucial regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy in vivo," *Nat. Cell Biol.*, vol. 3, no. 11, pp. 1014–1019, Nov. 2001.
- [30] M. K. Holz and J. Blenis, "Identification of S6 kinase 1 as a novel mammalian target of rapamycin (mTOR)-phosphorylating kinase," *J. Biol. Chem.*, vol. 280, no. 28, pp. 26089–26093, Jul. 2005.
- [31] A. McArdle, W. H. Dillmann, R. Mestril, J. A. Faulkner, and M. J. Jackson, "Overexpression of HSP70 in mouse skeletal muscle protects against muscle damage and age-related muscle dysfunction," *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.*, vol. 18, no. 2, pp. 355–357, Feb. 2004.
- [32] S. M. Gehrig, C. van der Poel, T. A. Sayer, J. D. Schertzer, D. C. Henstridge, J. E. Church, S. Lamon, A. P. Russell, K. E. Davies, M. A. Febbraio, and G. S. Lynch, "Hsp72 preserves muscle function and slows progression of severe muscular dystrophy," *Nature*, vol. 484, no. 7394, pp. 394–398, Apr. 2012.
- [33] Y. Nakai, H. Hashida, K. Kadota, M. Minami, K. Shimizu, I. Matsumoto, H. Kato, and K. Abe, "Up-regulation of genes related to the ubiquitin-proteasome system in the brown adipose tissue of 24-h-fasted rats," *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, vol. 72, no. 1, pp. 139–148, Jan. 2008.
- [34] C. Jamart, D. Naslain, H. Gilson, and M. Francaux, "Higher activation of autophagy in skeletal muscle of mice during endurance exercise in the fasted state," *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, vol. 305, no. 8, pp. E964–974, Oct. 2013.
- [35] "Nobel Prize in Chemistry, 2004. Aaron Ciechanover, Avram Hershko and Irwin Rose," *Indian J. Physiol. Pharmacol.*, vol. 49, no. 1, p. 121, Jan. 2005.
- [36] C. S. Mahanic, V. Budhavarapu, J. D. Graves, G. Li, and W.-C. Lin, "Regulation of E2 Promoter Binding Factor 1 (E2F1) transcriptional activity through a deubiquitinating enzyme, UCH37," *J. Biol. Chem.*, Sep. 2015.
- [37] C. Polge, D. Attaix, and D. Taillandier, "Role of E2-Ub-conjugating enzymes during skeletal muscle atrophy," *Front. Physiol.*, vol. 6, p. 59, 2015.
- [38] S. Lokireddy, I. W. Wijesoma, S. K. Sze, C. McFarlane, R. Kambadur, and M. Sharma, "Identification of atrogen-1-targeted proteins during the myostatin-induced skeletal muscle wasting," *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, vol. 303, no. 5, pp. C512–529, Sep. 2012.
- [39] A. Hershko and A. Ciechanover, "The ubiquitin system," *Annu. Rev. Biochem.*, vol. 67, pp. 425–479, 1998.
- [40] S. M. Molineaux, "Molecular pathways: targeting proteasomal protein degradation in cancer," *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.*, vol. 18, no. 1, pp. 15–20, Jan. 2012.
- [41] M. Bochtler, L. Ditzel, M. Groll, C. Hartmann, and R. Huber, "The proteasome," *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, vol. 28, pp. 295–317, 1999.
- [42] S. Schiaffino, K. A. Dyar, S. Ciciliot, B. Blaauw, and M. Sandri, "Mechanisms regulating skeletal muscle growth and atrophy," *FEBS J.*, vol. 280, no. 17, pp. 4294–4314, Sep. 2013.
- [43] M. Sandri, C. Sandri, A. Gilbert, C. Skurk, E. Calabria, A. Picard, K. Walsh, S. Schiaffino, S. H. Lecker, and A. L. Goldberg, "Foxo transcription factors induce the atrophy-related ubiquitin ligase atrogen-1 and cause skeletal muscle atrophy," *Cell*, vol. 117, no. 3, pp. 399–412, Apr. 2004.
- [44] J. Zhao, J. J. Brault, A. Schild, P. Cao, M. Sandri, S. Schiaffino, S. H. Lecker, and A. L. Goldberg, "FoxO3 coordinately activates protein degradation by the autophagic/lysosomal and proteasomal pathways in atrophying muscle cells," *Cell Metab.*, vol. 6, no. 6, pp. 472–483, Dec. 2007.
- [45] Y. Yamazaki, Y. Kamei, S. Sugita, F. Akaike, S. Kanai, S. Miura, Y. Hirata, B. R. Troen, T. Kitamura, I. Nishino, T. Suganami, O. Ezaki, and Y. Ogawa, "The cathepsin L gene is a direct target of FOXO1 in skeletal muscle," *Biochem. J.*, vol. 427, no. 1, pp. 171–178, Apr. 2010.
- [46] M. L. Riese, "Visual and auditory orienting responses in preterm infants: a comparison of three cohorts over time," *J. Genet. Psychol.*, vol. 153, no. 2, pp. 155–163, Jun. 1992.

- [47] S. Paturi, A. K. Gutta, A. Katta, S. K. Kakarla, R. K. Arvapalli, M. K. Gadde, S. K. Nalabotu, K. M. Rice, M. Wu, and E. Blough, "Effects of aging and gender on muscle mass and regulation of Akt-mTOR-p70s6k related signaling in the F344BN rat model," *Mech. Ageing Dev.*, vol. 131, no. 3, pp. 202–209, Mar. 2010.
- [48] M. Wu, A. Katta, M. K. Gadde, H. Liu, S. K. Kakarla, J. Fannin, S. Paturi, R. K. Arvapalli, K. M. Rice, Y. Wang, and E. R. Blough, "Aging-associated dysfunction of Akt/protein kinase B: S-nitrosylation and acetaminophen intervention," *PloS One*, vol. 4, no. 7, p. e6430, 2009.
- [49] H. W. Yung, D. S. Charnock-Jones, and G. J. Burton, "Regulation of AKT phosphorylation at Ser473 and Thr308 by endoplasmic reticulum stress modulates substrate specificity in a severity dependent manner," *PloS One*, vol. 6, no. 3, p. e17894, 2011.
- [50] T. N. Stitt, D. Drujan, B. A. Clarke, F. Panaro, Y. Timofeyeva, W. O. Kline, M. Gonzalez, G. D. Yancopoulos, and D. J. Glass, "The IGF-1/PI3K/Akt pathway prevents expression of muscle atrophy-induced ubiquitin ligases by inhibiting FOXO transcription factors," *Mol. Cell*, vol. 14, no. 3, pp. 395–403, May 2004.
- [51] K. Funai, J. D. Parkington, S. Carambula, and R. A. Fielding, "Age-associated decrease in contraction-induced activation of downstream targets of Akt/mTor signaling in skeletal muscle," *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, vol. 290, no. 4, pp. R1080–1086, Apr. 2006.
- [52] L. Lantier, J. Fentz, R. Mounier, J. Leclerc, J. T. Trebak, C. Pehmøller, N. Sanz, I. Sakakibara, E. Saint-Amand, S. Rimbaud, P. Maire, A. Marette, R. Ventura-Clapier, A. Ferry, J. F. P. Wojtaszewski, M. Foretz, and B. Viollet, "AMPK controls exercise endurance, mitochondrial oxidative capacity, and skeletal muscle integrity," *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.*, vol. 28, no. 7, pp. 3211–3224, Jul. 2014.
- [53] D. M. Gwinn, D. B. Shackelford, D. F. Egan, M. M. Mihaylova, A. Mery, D. S. Vasquez, B. E. Turk, and R. J. Shaw, "AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint," *Mol. Cell*, vol. 30, no. 2, pp. 214–226, Apr. 2008.
- [54] J. Kim, M. Kundu, B. Viollet, and K.-L. Guan, "AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1," *Nat. Cell Biol.*, vol. 13, no. 2, pp. 132–141, Feb. 2011.
- [55] A. M. J. Sanchez, A. Csibi, A. Raibon, K. Cornille, S. Gay, H. Bernardi, and R. Candau, "AMPK promotes skeletal muscle autophagy through activation of forkhead FoxO3a and interaction with Ulk1," *J. Cell. Biochem.*, vol. 113, no. 2, pp. 695–710, Feb. 2012.
- [56] R. M. Reznick, H. Zong, J. Li, K. Morino, I. K. Moore, H. J. Yu, Z.-X. Liu, J. Dong, K. J. Mustard, S. A. Hawley, D. Befroy, M. Pypaert, D. G. Hardie, L. H. Young, and G. I. Shulman, "Aging-associated reductions in AMP-activated protein kinase activity and mitochondrial biogenesis," *Cell Metab.*, vol. 5, no. 2, pp. 151–156, Feb. 2007.
- [57] A. Salminen and K. Kaarniranta, "AMP-activated protein kinase (AMPK) controls the aging process via an integrated signaling network," *Ageing Res. Rev.*, vol. 11, no. 2, pp. 230–241, Apr. 2012.
- [58] A. L. Bujak, J. D. Crane, J. S. Lally, R. J. Ford, S. J. Kang, I. A. Rebalka, A. E. Green, B. E. Kemp, T. J. Hawke, J. D. Schertzer, and G. R. Steinberg, "AMPK activation of muscle autophagy prevents fasting-induced hypoglycemia and myopathy during aging," *Cell Metab.*, vol. 21, no. 6, pp. 883–890, Jun. 2015.
- [59] M. Sandri, J. Lin, C. Handschin, W. Yang, Z. P. Arany, S. H. Lecker, A. L. Goldberg, and B. M. Spiegelman, "PGC-1alpha protects skeletal muscle from atrophy by suppressing FoxO3 action and atrophy-specific gene transcription," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 103, no. 44, pp. 16260–16265, Oct. 2006.
- [60] T. Wenz, S. G. Rossi, R. L. Rotundo, B. M. Spiegelman, and C. T. Moraes, "Increased muscle PGC-1alpha expression protects from sarcopenia and metabolic disease during aging," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 106, no. 48, pp. 20405–20410, Dec. 2009.
- [61] D. Dardevet, C. Sornet, M. Balage, and J. Grizard, "Stimulation of in vitro rat muscle protein synthesis by leucine decreases with age," *J. Nutr.*, vol. 130, no. 11, pp. 2630–2635, Nov. 2000.

- [62] L. Mosoni, M. C. Valluy, B. Serrurier, J. Prugnaud, C. Obled, C. Y. Guezennec, and P. P. Mirand, "Altered response of protein synthesis to nutritional state and endurance training in old rats," *Am. J. Physiol.*, vol. 268, no. 2 Pt 1, pp. E328–335, Feb. 1995.
- [63] L. Combaret, D. Dardevet, I. Rieu, M.-N. Pouch, D. Béchet, D. Taillandier, J. Grizard, and D. Attaix, "A leucine-supplemented diet restores the defective postprandial inhibition of proteasome-dependent proteolysis in aged rat skeletal muscle," *J. Physiol.*, vol. 569, no. Pt 2, pp. 489–499, Dec. 2005.
- [64] C. S. Katsanos, H. Kobayashi, M. Sheffield-Moore, A. Aarsland, and R. R. Wolfe, "Aging is associated with diminished accretion of muscle proteins after the ingestion of a small bolus of essential amino acids," *Am. J. Clin. Nutr.*, vol. 82, no. 5, pp. 1065–1073, Nov. 2005.
- [65] R. Ventura-Clapier, A. Garnier, and V. Veksler, "Transcriptional control of mitochondrial biogenesis: the central role of PGC-1 α ," *Cardiovasc. Res.*, vol. 79, no. 2, pp. 208–217, Jul. 2008.
- [66] J. R. Friedman, L. L. Lackner, M. West, J. R. DiBenedetto, J. Nunnari, and G. K. Voeltz, "ER tubules mark sites of mitochondrial division," *Science*, vol. 334, no. 6054, pp. 358–362, Oct. 2011.
- [67] M. Liesa, M. Palacín, and A. Zorzano, "Mitochondrial dynamics in mammalian health and disease," *Physiol. Rev.*, vol. 89, no. 3, pp. 799–845, Jul. 2009.
- [68] G. Twig, B. Hyde, and O. S. Shirihai, "Mitochondrial fusion, fission and autophagy as a quality control axis: the bioenergetic view," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1777, no. 9, pp. 1092–1097, Sep. 2008.
- [69] J. Clarimon, J. Johnson, R. Djaldetti, D. Hernandez, N. Hattori, H. Sroka, Y. Barhom, and A. Singleton, "Mutation of the Parkin gene in a Persian family: clinical progression over a 40-year period," *Mov. Disord. Off. J. Mov. Disord. Soc.*, vol. 20, no. 7, pp. 887–890, Jul. 2005.
- [70] V. P. Skulachev, "Mitochondrial filaments and clusters as intracellular power-transmitting cables," *Trends Biochem. Sci.*, vol. 26, no. 1, pp. 23–29, Jan. 2001.
- [71] M. Picard, K. White, and D. M. Turnbull, "Mitochondrial morphology, topology, and membrane interactions in skeletal muscle: a quantitative three-dimensional electron microscopy study," *J. Appl. Physiol. Bethesda Md 1985*, vol. 114, no. 2, pp. 161–171, Jan. 2013.
- [72] R. Ferreira, R. Vitorino, R. M. P. Alves, H. J. Appell, S. K. Powers, J. A. Duarte, and F. Amado, "Subsarcolemmal and intermyofibrillar mitochondria proteome differences disclose functional specializations in skeletal muscle," *Proteomics*, vol. 10, no. 17, pp. 3142–3154, Sep. 2010.
- [73] S. Servais, K. Couturier, H. Koubi, J. L. Rouanet, D. Desplanches, M. H. Sornay-Mayet, B. Sempore, J. M. Lavoie, and R. Favier, "Effect of voluntary exercise on H₂O₂ release by subsarcolemmal and intermyofibrillar mitochondria," *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 35, no. 1, pp. 24–32, Jul. 2003.
- [74] S. Hoppins, L. Lackner, and J. Nunnari, "The machines that divide and fuse mitochondria," *Annu. Rev. Biochem.*, vol. 76, pp. 751–780, 2007.
- [75] J.-P. Leduc-Gaudet, M. Picard, F. S.-J. Pelletier, N. Sgarlato, M.-J. Auger, J. Vallée, R. Robitaille, D. H. St-Pierre, and G. Gouspillou, "Mitochondrial morphology is altered in atrophied skeletal muscle of aged mice," *Oncotarget*, May 2015.
- [76] B. Chabi, V. Ljubicic, K. J. Menzies, J. H. Huang, A. Saleem, and D. A. Hood, "Mitochondrial function and apoptotic susceptibility in aging skeletal muscle," *Aging Cell*, vol. 7, no. 1, pp. 2–12, Jan. 2008.
- [77] A. Terman, T. Kurz, M. Navratil, E. A. Arriaga, and U. T. Brunk, "Mitochondrial turnover and aging of long-lived postmitotic cells: the mitochondrial-lysosomal axis theory of aging," *Antioxid. Redox Signal.*, vol. 12, no. 4, pp. 503–535, Apr. 2010.
- [78] M. Jimenez, C. Yvon, L. Lehr, B. Léger, P. Keller, A. Russell, F. Kuhne, P. Flandin, J.-P. Giacobino, and P. Muzzin, "Expression of uncoupling protein-3 in subsarcolemmal and

- intermyofibrillar mitochondria of various mouse muscle types and its modulation by fasting," *Eur. J. Biochem. FEBS*, vol. 269, no. 12, pp. 2878–2884, Jun. 2002.
- [79] J. Kerner, P. J. Turkaly, P. E. Minkler, and C. L. Hoppel, "Aging skeletal muscle mitochondria in the rat: decreased uncoupling protein-3 content," *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, vol. 281, no. 5, pp. E1054–1062, Nov. 2001.
- [80] G. Gouspillou, N. Sgarlato, S. Kapchinsky, F. Purves-Smith, B. Norris, C. H. Pion, S. Barbat-Artigas, F. Lemieux, T. Taivassalo, J. A. Morais, M. Aubertin-Leheudre, and R. T. Hepple, "Increased sensitivity to mitochondrial permeability transition and myonuclear translocation of endonuclease G in atrophied muscle of physically active older humans," *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.*, vol. 28, no. 4, pp. 1621–1633, Apr. 2014.
- [81] A. C. Betik, M. M. Thomas, K. J. Wright, C. D. Riel, and R. T. Hepple, "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.*, vol. 297, no. 3, pp. R744–755, Sep. 2009.
- [82] J. H. Huang, A.-M. Joseph, V. Ljubicic, S. Iqbal, and D. A. Hood, "Effect of age on the processing and import of matrix-destined mitochondrial proteins in skeletal muscle," *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.*, vol. 65, no. 2, pp. 138–146, Feb. 2010.
- [83] G. Gouspillou, I. Bourdel-Marchasson, R. Rouland, G. Calmettes, M. Biran, V. Deschodt-Arsac, S. Miraux, E. Thiaudiere, P. Pasdois, D. Detaille, J.-M. Franconi, M. Babot, V. Trézéguet, L. Arsac, and P. Diolez, "Mitochondrial energetics is impaired in vivo in aged skeletal muscle," *Ageing Cell*, vol. 13, no. 1, pp. 39–48, Feb. 2014.
- [84] S. Sugiyama, M. Takasawa, M. Hayakawa, and T. Ozawa, "Changes in skeletal muscle, heart and liver mitochondrial electron transport activities in rats and dogs of various ages," *Biochem. Mol. Biol. Int.*, vol. 30, no. 5, pp. 937–944, Aug. 1993.
- [85] A. J. Santanasto, N. W. Glynn, S. A. Jubrias, K. E. Conley, R. M. Boudreau, F. Amati, D. C. Mackey, E. M. Simonsick, E. S. Strotmeyer, P. M. Coen, B. H. Goodpaster, and A. B. Newman, "Skeletal Muscle Mitochondrial Function and Fatigability in Older Adults," *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.*, Aug. 2014.
- [86] U. F. Rasmussen, P. Krstrup, M. Kjaer, and H. N. Rasmussen, "Human skeletal muscle mitochondrial metabolism in youth and senescence: no signs of functional changes in ATP formation and mitochondrial oxidative capacity," *Pflüg. Arch. Eur. J. Physiol.*, vol. 446, no. 2, pp. 270–278, May 2003.
- [87] K. F. Petersen, D. Befroy, S. Dufour, J. Dziura, C. Ariyan, D. L. Rothman, L. DiPietro, G. W. Cline, and G. I. Shulman, "Mitochondrial dysfunction in the elderly: possible role in insulin resistance," *Science*, vol. 300, no. 5622, pp. 1140–1142, May 2003.
- [88] D. E. Kelley, J. P. Reilly, T. Veneman, and L. J. Mandarino, "Effects of insulin on skeletal muscle glucose storage, oxidation, and glycolysis in humans," *Am. J. Physiol.*, vol. 258, no. 6 Pt 1, pp. E923–929, Jun. 1990.
- [89] G. Stark, "Functional consequences of oxidative membrane damage," *J. Membr. Biol.*, vol. 205, no. 1, pp. 1–16, May 2005.
- [90] T. Ogata, S. Machida, Y. Oishi, M. Higuchi, and I. Muraoka, "Differential cell death regulation between adult-unloaded and aged rat soleus muscle," *Mech. Ageing Dev.*, vol. 130, no. 5, pp. 328–336, May 2009.
- [91] C. L. Xu, Y. Z. Wang, J. Guo, J. X. Liu, and J. Feng, "Comparison of age-related differences in expression of antioxidant enzyme mRNA and activity in various tissues of pigs," *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.*, vol. 147, no. 3, pp. 445–451, Jul. 2007.
- [92] P. Gianni, K. J. Jan, M. J. Douglas, P. M. Stuart, and M. A. Tarnopolsky, "Oxidative stress and the mitochondrial theory of aging in human skeletal muscle," *Exp. Gerontol.*, vol. 39, no. 9, pp. 1391–1400, Sep. 2004.
- [93] J. N. Copley, G. K. Sakellariou, D. J. Owens, S. Murray, S. Waldron, W. Gregson, W. D. Fraser, J. G. Burniston, L. A. Iwanejko, A. McArdle, J. P. Morton, M. J. Jackson, and G. L. Close, "Lifelong training preserves some redox-regulated adaptive responses after an

- acute exercise stimulus in aged human skeletal muscle,” *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 70, pp. 23–32, May 2014.
- [94] A. P. Halestrap and C. Brenner, “The adenine nucleotide translocase: a central component of the mitochondrial permeability transition pore and key player in cell death,” *Curr. Med. Chem.*, vol. 10, no. 16, pp. 1507–1525, Aug. 2003.
- [95] Y. Cho, B. C. Hazen, A. P. Russell, and A. Kralli, “Peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator 1 (PGC-1)- and estrogen-related receptor (ERR)-induced regulator in muscle 1 (Perm1) is a tissue-specific regulator of oxidative capacity in skeletal muscle cells,” *J. Biol. Chem.*, vol. 288, no. 35, pp. 25207–25218, Aug. 2013.
- [96] Y. Z. Feng, N. Nikolić, S. S. Bakke, M. V. Boekschoten, S. Kersten, E. T. Kase, A. C. Rustan, and G. H. Thoresen, “PPAR δ activation in human myotubes increases mitochondrial fatty acid oxidative capacity and reduces glucose utilization by a switch in substrate preference,” *Arch. Physiol. Biochem.*, vol. 120, no. 1, pp. 12–21, Feb. 2014.
- [97] A. Combes, J. Dekerle, N. Webborn, P. Watt, V. Bougault, and F. N. Daussin, “Exercise-induced metabolic fluctuations influence AMPK, p38-MAPK and CaMKII phosphorylation in human skeletal muscle,” *Physiol. Rep.*, vol. 3, no. 9, Sep. 2015.
- [98] N. R. C. Oliveira, S. O. Marques, T. F. Luciano, J. R. Pauli, L. P. Moura, E. Caperuto, B. L. S. Pieri, J. Engelmann, G. Scaini, E. L. Streck, F. S. Lira, R. A. Pinho, E. R. Ropelle, A. S. R. Silva, and C. T. De Souza, “Treadmill training increases SIRT-1 and PGC-1 α protein levels and AMPK phosphorylation in quadriceps of middle-aged rats in an intensity-dependent manner,” *Mediators Inflamm.*, vol. 2014, p. 987017, 2014.
- [99] A. Zetser, E. Gredinger, and E. Bengal, “p38 mitogen-activated protein kinase pathway promotes skeletal muscle differentiation. Participation of the Mef2c transcription factor,” *J. Biol. Chem.*, vol. 274, no. 8, pp. 5193–5200, Feb. 1999.
- [100] P. Puigserver, J. Rhee, J. Lin, Z. Wu, J. C. Yoon, C. Y. Zhang, S. Krauss, V. K. Mootha, B. B. Lowell, and B. M. Spiegelman, “Cytokine stimulation of energy expenditure through p38 MAP kinase activation of PPAR γ coactivator-1,” *Mol. Cell*, vol. 8, no. 5, pp. 971–982, Nov. 2001.
- [101] N. Poulouse and R. Raju, “Sirtuin regulation in aging and injury,” *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1852, no. 11, pp. 2442–2455, Nov. 2015.
- [102] O. M. Palacios, J. J. Carmona, S. Michan, K. Y. Chen, Y. Manabe, J. L. Ward, L. J. Goodyear, and Q. Tong, “Diet and exercise signals regulate SIRT3 and activate AMPK and PGC-1 α in skeletal muscle,” *Aging*, vol. 1, no. 9, pp. 771–783, Sep. 2009.
- [103] M. Sommer, N. Poliak, S. Upadhyay, E. Ratovitski, B. D. Nelkin, L. A. Donehower, and D. Sidransky, “DeltaNp63 α overexpression induces downregulation of Sirt1 and an accelerated aging phenotype in the mouse,” *Cell Cycle Georget. Tex.*, vol. 5, no. 17, pp. 2005–2011, Sep. 2006.
- [104] K. J. Menzies, K. Singh, A. Saleem, and D. A. Hood, “Sirtuin 1-mediated effects of exercise and resveratrol on mitochondrial biogenesis,” *J. Biol. Chem.*, vol. 288, no. 10, pp. 6968–6979, Mar. 2013.
- [105] J. S. Mohamed, J. C. Wilson, M. J. Myers, K. J. Sisson, and S. E. Alway, “Dysregulation of SIRT-1 in aging mice increases skeletal muscle fatigue by a PARP-1-dependent mechanism,” *Aging*, vol. 6, no. 10, pp. 820–834, Oct. 2014.
- [106] C. Kang, E. Chung, G. Diffie, and L. L. Ji, “Exercise training attenuates aging-associated mitochondrial dysfunction in rat skeletal muscle: role of PGC-1 α ,” *Exp. Gerontol.*, vol. 48, no. 11, pp. 1343–1350, Nov. 2013.
- [107] J. Lin, H. Wu, P. T. Tarr, C.-Y. Zhang, Z. Wu, O. Boss, L. F. Michael, P. Puigserver, E. Isotani, E. N. Olson, B. B. Lowell, R. Bassel-Duby, and B. M. Spiegelman, “Transcriptional co-activator PGC-1 α drives the formation of slow-twitch muscle fibres,” *Nature*, vol. 418, no. 6899, pp. 797–801, Aug. 2002.
- [108] Z. Arany, “PGC-1 coactivators and skeletal muscle adaptations in health and disease,” *Curr. Opin. Genet. Dev.*, vol. 18, no. 5, pp. 426–434, Oct. 2008.

- [109] J. F. Kerr, A. H. Wyllie, and A. R. Currie, "Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics," *Br. J. Cancer*, vol. 26, no. 4, pp. 239–257, Aug. 1972.
- [110] M. Pollack, S. Phaneuf, A. Dirks, and C. Leeuwenburgh, "The role of apoptosis in the normal aging brain, skeletal muscle, and heart," *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 959, pp. 93–107, Apr. 2002.
- [111] E. Marzetti, G. Privitera, V. Simili, S. E. Wohlgemuth, L. Aulisa, M. Pahor, and C. Leeuwenburgh, "Multiple pathways to the same end: mechanisms of myonuclear apoptosis in sarcopenia of aging," *ScientificWorldJournal*, vol. 10, pp. 340–349, 2010.
- [112] J. Campisi, "Aging, cellular senescence, and cancer," *Annu. Rev. Physiol.*, vol. 75, pp. 685–705, 2013.
- [113] R. L. Reece, "Corporate transformation of medicine in Minnesota: have Twin Cities' HMOs peaked? And other megaquestions," *Minn. Med.*, vol. 69, no. 1, pp. 7–11, Jan. 1986.
- [114] D. L. Kirk, R. Birchem, and N. King, "The extracellular matrix of Volvox: a comparative study and proposed system of nomenclature," *J. Cell Sci.*, vol. 80, pp. 207–231, Feb. 1986.
- [115] J. Krishnamurthy, C. Torrice, M. R. Ramsey, G. I. Kovalev, K. Al-Regaiey, L. Su, and N. E. Sharpless, "Ink4a/Arf expression is a biomarker of aging," *J. Clin. Invest.*, vol. 114, no. 9, pp. 1299–1307, Nov. 2004.
- [116] D. J. Baker, T. Wijshake, T. Tchkonja, N. K. LeBrasseur, B. G. Childs, B. van de Sluis, J. L. Kirkland, and J. M. van Deursen, "Clearance of p16Ink4a-positive senescent cells delays ageing-associated disorders," *Nature*, vol. 479, no. 7372, pp. 232–236, Nov. 2011.
- [117] N. A. Dumont, Y. X. Wang, and M. A. Rudnicki, "Intrinsic and extrinsic mechanisms regulating satellite cell function," *Dev. Camb. Engl.*, vol. 142, no. 9, pp. 1572–1581, May 2015.
- [118] P. L. Puri and V. Sartorelli, "Regulation of muscle regulatory factors by DNA-binding, interacting proteins, and post-transcriptional modifications," *J. Cell. Physiol.*, vol. 185, no. 2, pp. 155–173, Nov. 2000.
- [119] S. D. Gopinath, A. E. Webb, A. Brunet, and T. A. Rando, "FOXO3 promotes quiescence in adult muscle stem cells during the process of self-renewal," *Stem Cell Rep.*, vol. 2, no. 4, pp. 414–426, Apr. 2014.
- [120] M. T. Tierney, T. Aydogdu, D. Sala, B. Malecova, S. Gatto, P. L. Puri, L. Latella, and A. Sacco, "STAT3 signaling controls satellite cell expansion and skeletal muscle repair," *Nat. Med.*, vol. 20, no. 10, pp. 1182–1186, Oct. 2014.
- [121] J. D. Bernet, J. D. Doles, J. K. Hall, K. Kelly Tanaka, T. A. Carter, and B. B. Olwin, "p38 MAPK signaling underlies a cell-autonomous loss of stem cell self-renewal in skeletal muscle of aged mice," *Nat. Med.*, vol. 20, no. 3, pp. 265–271, Mar. 2014.
- [122] J. V. Chakkalakal, K. M. Jones, M. A. Basson, and A. S. Brack, "The aged niche disrupts muscle stem cell quiescence," *Nature*, vol. 490, no. 7420, pp. 355–360, Oct. 2012.
- [123] P. Sousa-Victor, S. Gutarra, L. García-Prat, J. Rodríguez-Ubrea, L. Ortet, V. Ruiz-Bonilla, M. Jardí, E. Ballestar, S. González, A. L. Serrano, E. Perdiguero, and P. Muñoz-Cánoves, "Geriatric muscle stem cells switch reversible quiescence into senescence," *Nature*, vol. 506, no. 7488, pp. 316–321, Feb. 2014.
- [124] M. Sinha, Y. C. Jang, J. Oh, D. Khong, E. Y. Wu, R. Manohar, C. Miller, S. G. Regalado, F. S. Loffredo, J. R. Pancoast, M. F. Hirshman, J. Lebowitz, J. L. Shadrach, M. Cerletti, M.-J. Kim, T. Serwold, L. J. Goodyear, B. Rosner, R. T. Lee, and A. J. Wagers, "Restoring systemic GDF11 levels reverses age-related dysfunction in mouse skeletal muscle," *Science*, vol. 344, no. 6184, pp. 649–652, May 2014.
- [125] I. M. Conboy and T. A. Rando, "Heterochronic parabiosis for the study of the effects of aging on stem cells and their niches," *Cell Cycle Georget. Tex.*, vol. 11, no. 12, pp. 2260–2267, Jun. 2012.
- [126] M. Gonzalez-Freire, R. de Cabo, S. A. Studenski, and L. Ferrucci, "The Neuromuscular Junction: Aging at the Crossroad between Nerves and Muscle," *Front. Aging Neurosci.*, vol. 6, p. 208, 2014.

- [127] Y. Nabeshima, K. Hanaoka, M. Hayasaka, E. Esumi, S. Li, I. Nonaka, and Y. Nabeshima, "Myogenin gene disruption results in perinatal lethality because of severe muscle defect," *Nature*, vol. 364, no. 6437, pp. 532–535, Aug. 1993.
- [128] L. S. Mathews, R. E. Hammer, R. R. Behringer, A. J. D'Ercole, G. I. Bell, R. L. Brinster, and R. D. Palmiter, "Growth enhancement of transgenic mice expressing human insulin-like growth factor I," *Endocrinology*, vol. 123, no. 6, pp. 2827–2833, Dec. 1988.
- [129] R. W. Matheny, W. Matheny, E. Merritt, S. V. Zannikos, R. P. Farrar, and M. L. Adamo, "Serum IGF-I-deficiency does not prevent compensatory skeletal muscle hypertrophy in resistance exercise," *Exp. Biol. Med. Maywood NJ*, vol. 234, no. 2, pp. 164–170, Feb. 2009.
- [130] C. A. Benbassat, K. C. Maki, and T. G. Unterman, "Circulating levels of insulin-like growth factor (IGF) binding protein-1 and -3 in aging men: relationships to insulin, glucose, IGF, and dehydroepiandrosterone sulfate levels and anthropometric measures," *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 82, no. 5, pp. 1484–1491, May 1997.
- [131] B. Léger, W. Derave, K. De Bock, P. Hespel, and A. P. Russell, "Human sarcopenia reveals an increase in SOCS-3 and myostatin and a reduced efficiency of Akt phosphorylation," *Rejuvenation Res.*, vol. 11, no. 1, pp. 163–175B, Feb. 2008.
- [132] A. C. McPherron, A. M. Lawler, and S. J. Lee, "Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member," *Nature*, vol. 387, no. 6628, pp. 83–90, May 1997.
- [133] A. U. Trendelenburg, A. Meyer, D. Rohner, J. Boyle, S. Hatakeyama, and D. J. Glass, "Myostatin reduces Akt/TORC1/p70S6K signaling, inhibiting myoblast differentiation and myotube size," *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, vol. 296, no. 6, pp. C1258–1270, Jun. 2009.
- [134] A. Retamales, R. Zuloaga, C. A. Valenzuela, C. Gallardo-Escarate, A. Molina, and J. A. Valdés, "Insulin-like growth factor-1 suppresses the Myostatin signaling pathway during myogenic differentiation," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 464, no. 2, pp. 596–602, Aug. 2015.
- [135] H. R. Bergen, J. N. Farr, P. M. Vanderboom, E. J. Atkinson, T. A. White, R. J. Singh, S. Khosla, and N. K. LeBrasseur, "Myostatin as a mediator of sarcopenia versus homeostatic regulator of muscle mass: insights using a new mass spectrometry-based assay," *Skelet. Muscle*, vol. 5, p. 21, 2015.
- [136] G. Valenti, L. Denti, M. Maggio, G. Ceda, S. Volpato, S. Bandinelli, G. Ceresini, A. Cappola, J. M. Guralnik, and L. Ferrucci, "Effect of DHEAS on skeletal muscle over the life span: the InCHIANTI study," *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.*, vol. 59, no. 5, pp. 466–472, May 2004.
- [137] Finch and Mobbs, "Nonlethal measurements involving steroids and neurotransmitters as reflections of physiological aging," *Biological Markers of Aging by Reff, M.E., and Schneider, E.L. (eds) 1982, Baltimore, USDHHS, NIH Publication*, pp. 30–41, 1982.
- [138] R. Singh, S. Bhasin, M. Braga, J. N. Artaza, S. Pervin, W. E. Taylor, V. Krishnan, S. K. Sinha, T. B. Rajavashisth, and R. Jasuja, "Regulation of myogenic differentiation by androgens: cross talk between androgen receptor/ beta-catenin and follistatin/transforming growth factor-beta signaling pathways," *Endocrinology*, vol. 150, no. 3, pp. 1259–1268, Mar. 2009.
- [139] M. Braga, S. Bhasin, R. Jasuja, S. Pervin, and R. Singh, "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.*, vol. 350, no. 1, pp. 39–52, Mar. 2012.
- [140] H. A. Feldman, C. Longcope, C. A. Derby, C. B. Johannes, A. B. Araujo, A. D. Coviello, W. J. Bremner, and J. B. McKinlay, "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.*, vol. 87, no. 2, pp. 589–598, Feb. 2002.
- [141] M. D. L. O'Connell and F. C. W. Wu, "Androgen effects on skeletal muscle: implications for the development and management of frailty," *Asian J. Androl.*, vol. 16, no. 2, pp. 203–212, Apr. 2014.

- [142] T. Suda, R. Masuyama, R. Bouillon, and G. Carmeliet, "Physiological functions of vitamin D: what we have learned from global and conditional VDR knockout mouse studies," *Curr. Opin. Pharmacol.*, vol. 22, pp. 87–99, Jun. 2015.
- [143] C. M. Girgis, K. M. Cha, P. J. Houweling, R. Rao, N. Mokbel, M. Lin, R. J. Clifton-Bligh, and J. E. Gunton, "Vitamin D Receptor Ablation and Vitamin D Deficiency Result in Reduced Grip Strength, Altered Muscle Fibers, and Increased Myostatin in Mice," *Calcif. Tissue Int.*, Sep. 2015.
- [144] I. Endo, D. Inoue, T. Mitsui, Y. Umaki, M. Akaike, T. Yoshizawa, S. Kato, and T. Matsumoto, "Deletion of vitamin D receptor gene in mice results in abnormal skeletal muscle development with deregulated expression of myoregulatory transcription factors," *Endocrinology*, vol. 144, no. 12, pp. 5138–5144, Dec. 2003.
- [145] J. M. Lappe and N. Binkley, "Vitamin D and Sarcopenia/Falls," *J. Clin. Densitom. Off. J. Int. Soc. Clin. Densitom.*, Jun. 2015.
- [146] J. B. Richards, A. M. Valdes, J. P. Gardner, D. Paximadas, M. Kimura, A. Nessa, X. Lu, G. L. Surdulescu, R. Swaminathan, T. D. Spector, and A. Aviv, "Higher serum vitamin D concentrations are associated with longer leukocyte telomere length in women," *Am. J. Clin. Nutr.*, vol. 86, no. 5, pp. 1420–1425, Nov. 2007.
- [147] C. Franceschi, M. Bonafè, S. Valensin, F. Olivieri, M. De Luca, E. Ottaviani, and G. De Benedictis, "Inflamm-aging. An evolutionary perspective on immunosenescence," *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 908, pp. 244–254, Jun. 2000.
- [148] M. Michaud, L. Balardy, G. Moulis, C. Gaudin, C. Peyrot, B. Vellas, M. Cesari, and F. Nourhashemi, "Proinflammatory cytokines, aging, and age-related diseases," *J. Am. Med. Dir. Assoc.*, vol. 14, no. 12, pp. 877–882, Dec. 2013.
- [149] J. G. Tidball, "Inflammatory processes in muscle injury and repair," *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, vol. 288, no. 2, pp. R345–353, Feb. 2005.
- [150] S. Raschke and J. Eckel, "Adipo-myokines: two sides of the same coin--mediators of inflammation and mediators of exercise," *Mediators Inflamm.*, vol. 2013, p. 320724, 2013.
- [151] B. K. Pedersen, "Muscle as a secretory organ," *Compr. Physiol.*, vol. 3, no. 3, pp. 1337–1362, Jul. 2013.
- [152] M. Barbieri, L. Ferrucci, E. Ragno, A. Corsi, S. Bandinelli, M. Bonafè, F. Olivieri, S. Giovagnetti, C. Franceschi, J. M. Guralnik, and G. Paolisso, "Chronic inflammation and the effect of IGF-I on muscle strength and power in older persons," *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, vol. 284, no. 3, pp. E481–487, Mar. 2003.
- [153] R. C. J. Langen, J. L. J. Van Der Velden, A. M. W. J. Schols, M. C. J. M. Kelders, E. F. M. Wouters, and Y. M. W. Janssen-Heininger, "Tumor necrosis factor-alpha inhibits myogenic differentiation through MyoD protein destabilization," *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.*, vol. 18, no. 2, pp. 227–237, Feb. 2004.
- [154] S. A. Whitman, M. J. Wacker, S. R. Richmond, and M. P. Godard, "Contributions of the ubiquitin-proteasome pathway and apoptosis to human skeletal muscle wasting with age," *Pflüg. Arch. Eur. J. Physiol.*, vol. 450, no. 6, pp. 437–446, Sep. 2005.
- [155] I. Lavrik, A. Golks, and P. H. Krammer, "Death receptor signaling," *J. Cell Sci.*, vol. 118, no. Pt 2, pp. 265–267, Jan. 2005.
- [156] B. J. Hardin, K. S. Campbell, J. D. Smith, S. Arbogast, J. Smith, J. S. Moylan, and M. B. Reid, "TNF-alpha acts via TNFR1 and muscle-derived oxidants to depress myofibrillar force in murine skeletal muscle," *J. Appl. Physiol. Bethesda Md 1985*, vol. 104, no. 3, pp. 694–699, Mar. 2008.
- [157] T. G. Graber, J.-H. Kim, R. W. Grange, L. K. McLoon, and L. V. Thompson, "C57BL/6 life span study: age-related declines in muscle power production and contractile velocity," *Age Dordr. Neth.*, vol. 37, no. 3, p. 9773, Jun. 2015.
- [158] J. Walston, N. Fedarko, H. Yang, S. Leng, B. Beamer, S. Espinoza, A. Lipton, H. Zheng, and K. Becker, "The physical and biological characterization of a frail mouse model," *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.*, vol. 63, no. 4, pp. 391–398, Apr. 2008.

- [159] A.-Y. Guo, K.-S. Leung, M.-F. Siu, J.-H. Qin, S. K.-H. Chow, L. Qin, C.-Y. Li, and W.-H. Cheung, "Muscle mass, structural and functional investigations of senescence-accelerated mouse P8 (SAMP8)," *Exp. Anim. Jpn. Assoc. Lab. Anim. Sci.*, Jul. 2015.
- [160] S. J. E. Suijkerbuijk, M. H. J. van Osch, F. L. Bos, S. Hanks, N. Rahman, and G. J. P. L. Kops, "Molecular causes for BUBR1 dysfunction in the human cancer predisposition syndrome mosaic variegated aneuploidy," *Cancer Res.*, vol. 70, no. 12, pp. 4891–4900, Jun. 2010.
- [161] D. J. Baker, M. M. Dawlaty, T. Wijshake, K. B. Jeganathan, L. Malureanu, J. H. van Ree, R. Crespo-Diaz, S. Reyes, L. Seaburg, V. Shapiro, A. Behfar, A. Terzic, B. van de Sluis, and J. M. van Deursen, "Increased expression of BubR1 protects against aneuploidy and cancer and extends healthy lifespan," *Nat. Cell Biol.*, vol. 15, no. 1, pp. 96–102, Jan. 2013.
- [162] M. Lebel, "Werner syndrome: genetic and molecular basis of a premature aging disorder," *Cell. Mol. Life Sci. CMLS*, vol. 58, no. 7, pp. 857–867, Jun. 2001.
- [163] T. Tamaki, M. Hirata, and Y. Uchiyama, "Qualitative alteration of peripheral motor system begins prior to appearance of typical sarcopenia syndrome in middle-aged rats," *Front. Aging Neurosci.*, vol. 6, p. 296, 2014.
- [164] V. B. Vays, C. M. Eldarov, I. M. Vangely, N. G. Kolosova, L. E. Bakeeva, and V. P. Skulachev, "Antioxidant SkQ1 delays sarcopenia-associated damage of mitochondrial ultrastructure," *Aging*, vol. 6, no. 2, pp. 140–148, Feb. 2014.
- [165] M. Rai, U. Nongthomba, and M. D. Grounds, "Skeletal muscle degeneration and regeneration in mice and flies," *Curr. Top. Dev. Biol.*, vol. 108, pp. 247–281, 2014.
- [166] H. Aguilaniu, J. Durieux, and A. Dillin, "Metabolism, ubiquinone synthesis, and longevity," *Genes Dev.*, vol. 19, no. 20, pp. 2399–2406, Oct. 2005.
- [167] J. R. Vanfleteren and B. P. Braeckman, "Mechanisms of life span determination in *Caenorhabditis elegans*," *Neurobiol. Aging*, vol. 20, no. 5, pp. 487–502, Oct. 1999.
- [168] L. A. Herndon, P. J. Schmeissner, J. M. Dudaronek, P. A. Brown, K. M. Listner, Y. Sakano, M. C. Paupard, D. H. Hall, and M. Driscoll, "Stochastic and genetic factors influence tissue-specific decline in ageing *C. elegans*," *Nature*, vol. 419, no. 6909, pp. 808–814, Oct. 2002.
- [169] I. Harel, B. A. Benayoun, B. Machado, P. P. Singh, C.-K. Hu, M. F. Pech, D. R. Valenzano, E. Zhang, S. C. Sharp, S. E. Artandi, and A. Brunet, "A platform for rapid exploration of aging and diseases in a naturally short-lived vertebrate," *Cell*, vol. 160, no. 5, pp. 1013–1026, Feb. 2015.
- [170] C. T. Davies, D. O. Thomas, and M. J. White, "Mechanical properties of young and elderly human muscle," *Acta Med. Scand. Suppl.*, vol. 711, pp. 219–226, 1986.
- [171] E. Witvrouw, N. Mahieu, P. Roosen, and P. McNair, "The role of stretching in tendon injuries," *Br. J. Sports Med.*, vol. 41, no. 4, pp. 224–226, Apr. 2007.
- [172] M. M. Porter, A. Myint, J. F. Kramer, and A. A. Vandervoort, "Concentric and eccentric knee extension strength in older and younger men and women," *Can. J. Appl. Physiol. Rev. Can. Physiol. Appliquée*, vol. 20, no. 4, pp. 429–439, Dec. 1995.
- [173] C. E. Garber, B. Blissmer, M. R. Deschenes, B. A. Franklin, M. J. Lamonte, I.-M. Lee, D. C. Nieman, D. P. Swain, and American College of Sports Medicine, "American College of Sports Medicine position stand. Quantity and quality of exercise for developing and maintaining cardiorespiratory, musculoskeletal, and neuromotor fitness in apparently healthy adults: guidance for prescribing exercise," *Med. Sci. Sports Exerc.*, vol. 43, no. 7, pp. 1334–1359, Jul. 2011.
- [174] C. N. Meredith, W. R. Frontera, E. C. Fisher, V. A. Hughes, J. C. Herland, J. Edwards, and W. J. Evans, "Peripheral effects of endurance training in young and old subjects," *J. Appl. Physiol. Bethesda Md 1985*, vol. 66, no. 6, pp. 2844–2849, Jun. 1989.
- [175] M. Izquierdo, J. Ibañez, K. Hakkinen, W. J. Kraemer, J. L. Larión, and E. M. Gorostiaga, "Once weekly combined resistance and cardiovascular training in healthy older men," *Med. Sci. Sports Exerc.*, vol. 36, no. 3, pp. 435–443, Mar. 2004.

- [176] E. L. Cadore, R. S. Pinto, F. L. R. Lhullier, C. S. Correa, C. L. Alberton, S. S. Pinto, A. P. V. Almeida, M. P. Tartaruga, E. M. Silva, and L. F. M. Krueel, "Physiological effects of concurrent training in elderly men," *Int. J. Sports Med.*, vol. 31, no. 10, pp. 689–697, Oct. 2010.
- [177] R. T. Hepple, S. L. Mackinnon, S. G. Thomas, J. M. Goodman, and M. J. Plyley, "Quantitating the capillary supply and the response to resistance training in older men," *Pflüg. Arch. Eur. J. Physiol.*, vol. 433, no. 3, pp. 238–244, Jan. 1997.
- [178] R. A. Fielding, N. K. LeBrasseur, A. Cuoco, J. Bean, K. Mizer, and M. A. Fiatarone Singh, "High-velocity resistance training increases skeletal muscle peak power in older women," *J. Am. Geriatr. Soc.*, vol. 50, no. 4, pp. 655–662, Apr. 2002.
- [179] W. W. Campbell, L. J. Kruskall, and W. J. Evans, "Lower body versus whole body resistive exercise training and energy requirements of older men and women," *Metabolism.*, vol. 51, no. 8, pp. 989–997, Aug. 2002.
- [180] B. H. Goodpaster, P. Chomentowski, B. K. Ward, A. Rossi, N. W. Glynn, M. J. Delmonico, S. B. Kritchevsky, M. Pahor, and A. B. Newman, "Effects of physical activity on strength and skeletal muscle fat infiltration in older adults: a randomized controlled trial," *J. Appl. Physiol. Bethesda Md 1985*, vol. 105, no. 5, pp. 1498–1503, Nov. 2008.
- [181] P. T. V. Farinatti, A. A. R. Gerales, M. F. Bottaro, M. V. I. C. Lima, R. B. Albuquerque, and S. J. Fleck, "Effects of different resistance training frequencies on the muscle strength and functional performance of active women older than 60 years," *J. Strength Cond. Res. Natl. Strength Cond. Assoc.*, vol. 27, no. 8, pp. 2225–2234, Aug. 2013.
- [182] K. Häkkinen, W. J. Kraemer, R. U. Newton, and M. Alen, "Changes in electromyographic activity, muscle fibre and force production characteristics during heavy resistance/power strength training in middle-aged and older men and women," *Acta Physiol. Scand.*, vol. 171, no. 1, pp. 51–62, Jan. 2001.
- [183] D. Paddon-Jones and B. B. Rasmussen, "Dietary protein recommendations and the prevention of sarcopenia," *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care*, vol. 12, no. 1, pp. 86–90, Jan. 2009.
- [184] F. Tremblay, H. Jacques, and A. Marette, "Modulation of insulin action by dietary proteins and amino acids: role of the mammalian target of rapamycin nutrient sensing pathway," *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care*, vol. 8, no. 4, pp. 457–462, Jul. 2005.
- [185] J. E. Morley, J. M. Argiles, W. J. Evans, S. Bhasin, D. Cella, N. E. P. Deutz, W. Doehner, K. C. H. Fearon, L. Ferrucci, M. K. Hellerstein, K. Kalantar-Zadeh, H. Lochs, N. MacDonald, K. Mulligan, M. Muscaritoli, P. Ponikowski, M. E. Posthauer, F. Rossi Fanelli, M. Schambelan, A. M. W. J. Schols, M. W. Schuster, S. D. Anker, and Society for Sarcopenia, Cachexia, and Wasting Disease, "Nutritional recommendations for the management of sarcopenia," *J. Am. Med. Dir. Assoc.*, vol. 11, no. 6, pp. 391–396, Jul. 2010.
- [186] B. Pennings, B. Groen, A. de Lange, A. P. Gijsen, A. H. Zorenc, J. M. G. Senden, and L. J. C. van Loon, "Amino acid absorption and subsequent muscle protein accretion following graded intakes of whey protein in elderly men," *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, vol. 302, no. 8, pp. E992–999, Apr. 2012.
- [187] J. S. Greiwe, G. Kwon, M. L. McDaniel, and C. F. Semenkovich, "Leucine and insulin activate p70 S6 kinase through different pathways in human skeletal muscle," *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, vol. 281, no. 3, pp. E466–471, Sep. 2001.
- [188] C. P. M. Sharp and D. R. Pearson, "Amino acid supplements and recovery from high-intensity resistance training," *J. Strength Cond. Res. Natl. Strength Cond. Assoc.*, vol. 24, no. 4, pp. 1125–1130, Apr. 2010.
- [189] S. A. Smith, S. J. Montain, R. P. Matott, G. P. Zientara, F. A. Jolesz, and R. A. Fielding, "Creatine supplementation and age influence muscle metabolism during exercise," *J. Appl. Physiol. Bethesda Md 1985*, vol. 85, no. 4, pp. 1349–1356, Oct. 1998.
- [190] E. S. Rawson, P. M. Clarkson, T. B. Price, and M. P. Miles, "Differential response of muscle phosphocreatine to creatine supplementation in young and old subjects," *Acta Physiol. Scand.*, vol. 174, no. 1, pp. 57–65, Jan. 2002.

- [191] L. A. Gotshalk, J. S. Volek, R. S. Staron, C. R. Denegar, F. C. Hagerman, and W. J. Kraemer, "Creatine supplementation improves muscular performance in older men," *Med. Sci. Sports Exerc.*, vol. 34, no. 3, pp. 537–543, Mar. 2002.
- [192] D. G. Candow and P. D. Chilibeck, "Timing of creatine or protein supplementation and resistance training in the elderly," *Appl. Physiol. Nutr. Metab. Physiol. Appliquée Nutr. Métabolisme*, vol. 33, no. 1, pp. 184–190, Feb. 2008.
- [193] J.-H. Kim, Y. Lee, H.-B. Kwak, and J. M. Lawler, "Lifelong wheel running exercise and mild caloric restriction attenuate nuclear EndoG in the aging plantaris muscle," *Exp. Gerontol.*, vol. 69, pp. 122–128, Sep. 2015.
- [194] S. H. McKiernan, R. J. Colman, M. Lopez, T. M. Beasley, J. M. Aiken, R. M. Anderson, and R. Weindruch, "Caloric restriction delays aging-induced cellular phenotypes in rhesus monkey skeletal muscle," *Exp. Gerontol.*, vol. 46, no. 1, pp. 23–29, Jan. 2011.
- [195] Y. C. Jang, Y. Liu, C. R. Hayworth, A. Bhattacharya, M. S. Lustgarten, F. L. Muller, A. Chaudhuri, W. Qi, Y. Li, J.-Y. Huang, E. Verdin, A. Richardson, and H. Van Remmen, "Dietary restriction attenuates age-associated muscle atrophy by lowering oxidative stress in mice even in complete absence of CuZnSOD," *Aging Cell*, vol. 11, no. 5, pp. 770–782, Oct. 2012.
- [196] T. Phillips and C. Leeuwenburgh, "Muscle fiber specific apoptosis and TNF-alpha signaling in sarcopenia are attenuated by life-long calorie restriction," *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.*, vol. 19, no. 6, pp. 668–670, Apr. 2005.
- [197] B. Drew, S. Phaneuf, A. Dirks, C. Selman, R. Gredilla, A. Lezza, G. Barja, and C. Leeuwenburgh, "Effects of aging and caloric restriction on mitochondrial energy production in gastrocnemius muscle and heart," *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, vol. 284, no. 2, pp. R474–480, Feb. 2003.
- [198] E. Ravussin, L. M. Redman, J. Rochon, S. K. Das, L. Fontana, W. E. Kraus, S. Romashkan, D. A. Williamson, S. N. Meydani, D. T. Villareal, S. R. Smith, R. I. Stein, T. M. Scott, T. M. Stewart, E. Saltzman, S. Klein, M. Bhapkar, C. K. Martin, C. H. Gilhooly, J. O. Holloszy, E. C. Hadley, S. B. Roberts, and CALERIE Study Group, "A 2-Year Randomized Controlled Trial of Human Caloric Restriction: Feasibility and Effects on Predictors of Health Span and Longevity," *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.*, vol. 70, no. 9, pp. 1097–1104, Sep. 2015.
- [199] Y. Sato, J. Iwamoto, T. Kanoko, and K. Satoh, "Low-dose vitamin D prevents muscular atrophy and reduces falls and hip fractures in women after stroke: a randomized controlled trial," *Cerebrovasc. Dis. Basel Switz.*, vol. 20, no. 3, pp. 187–192, 2005.
- [200] H. A. Bischoff-Ferrari, B. Dawson-Hughes, H. B. Staehelin, J. E. Orav, A. E. Stuck, R. Theiler, J. B. Wong, A. Egli, D. P. Kiel, and J. Henschkowski, "Fall prevention with supplemental and active forms of vitamin D: a meta-analysis of randomised controlled trials," *BMJ*, vol. 339, p. b3692, 2009.
- [201] C. Annweiler, A.-M. Schott, G. Berrut, V. Chauviré, D. Le Gall, M. Inzitari, and O. Beauchet, "Vitamin D and ageing: neurological issues," *Neuropsychobiology*, vol. 62, no. 3, pp. 139–150, Aug. 2010.
- [202] B. L. Halvorsen, K. Holte, M. C. W. Myhrstad, I. Barikmo, E. Hvattum, S. F. Remberg, A.-B. Wold, K. Haffner, H. Baugerød, L. F. Andersen, Ø. Moskaug, D. R. Jacobs, and R. Blomhoff, "A systematic screening of total antioxidants in dietary plants," *J. Nutr.*, vol. 132, no. 3, pp. 461–471, Mar. 2002.
- [203] R. D. Semba, C. Blaum, J. M. Guralnik, D. T. Moncrief, M. O. Ricks, and L. P. Fried, "Carotenoid and vitamin E status are associated with indicators of sarcopenia among older women living in the community," *Aging Clin. Exp. Res.*, vol. 15, no. 6, pp. 482–487, Dec. 2003.
- [204] R. D. Semba, F. Lauretani, and L. Ferrucci, "Carotenoids as protection against sarcopenia in older adults," *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 458, no. 2, pp. 141–145, Feb. 2007.
- [205] M. Meydani, W. J. Evans, G. Handelman, L. Biddle, R. A. Fielding, S. N. Meydani, J. Burrill, M. A. Fiatarone, J. B. Blumberg, and J. G. Cannon, "Protective effect of vitamin E

- on exercise-induced oxidative damage in young and older adults,” *Am. J. Physiol.*, vol. 264, no. 5 Pt 2, pp. R992–998, May 1993.
- [206] J. M. Satchek, P. E. Milbury, J. G. Cannon, R. Roubenoff, and J. B. Blumberg, “Effect of vitamin E and eccentric exercise on selected biomarkers of oxidative stress in young and elderly men,” *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 34, no. 12, pp. 1575–1588, Jun. 2003.
- [207] S.-J. Park, F. Ahmad, A. Philp, K. Baar, T. Williams, H. Luo, H. Ke, H. Rehmann, R. Taussig, A. L. Brown, M. K. Kim, M. A. Beaven, A. B. Burgin, V. Manganiello, and J. H. Chung, “Resveratrol ameliorates aging-related metabolic phenotypes by inhibiting cAMP phosphodiesterases,” *Cell*, vol. 148, no. 3, pp. 421–433, Feb. 2012.
- [208] J. R. Jackson, M. J. Ryan, and S. E. Alway, “Long-term supplementation with resveratrol alleviates oxidative stress but does not attenuate sarcopenia in aged mice,” *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.*, vol. 66, no. 7, pp. 751–764, Jul. 2011.
- [209] S. B. Ballak, R. T. Jaspers, L. Deldicque, S. Chalil, E. L. Peters, A. de Haan, and H. Degens, “Blunted hypertrophic response in old mouse muscle is associated with a lower satellite cell density and is not alleviated by resveratrol,” *Exp. Gerontol.*, vol. 62, pp. 23–31, Feb. 2015.
- [210] R. D. Ray Hamidie, T. Yamada, R. Ishizawa, Y. Saito, and K. Masuda, “Curcumin treatment enhances the effect of exercise on mitochondrial biogenesis in skeletal muscle by increasing cAMP levels,” *Metabolism.*, Jul. 2015.
- [211] C. N. Serhan, N. Chiang, and T. E. Van Dyke, “Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators,” *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 8, no. 5, pp. 349–361, May 2008.
- [212] G. I. Smith, P. Atherton, D. N. Reeds, B. S. Mohammed, D. Rankin, M. J. Rennie, and B. Mittendorfer, “Dietary omega-3 fatty acid supplementation increases the rate of muscle protein synthesis in older adults: a randomized controlled trial,” *Am. J. Clin. Nutr.*, vol. 93, no. 2, pp. 402–412, Feb. 2011.
- [213] C. L. N. Rodacki, A. L. F. Rodacki, G. Pereira, K. Naliwaiko, I. Coelho, D. Pequito, and L. C. Fernandes, “Fish-oil supplementation enhances the effects of strength training in elderly women,” *Am. J. Clin. Nutr.*, vol. 95, no. 2, pp. 428–436, Feb. 2012.
- [214] K. P. Shannon, A. King, I. Phillips, M. H. Nicolas, and A. Philippon, “Importance of organisms producing broad-spectrum SHV-group beta-lactamases into the United Kingdom,” *J. Antimicrob. Chemother.*, vol. 25, no. 3, pp. 343–351, Mar. 1990.
- [215] I. M. Conboy, M. J. Conboy, A. J. Wagers, E. R. Girma, I. L. Weissman, and T. A. Rando, “Rejuvenation of aged progenitor cells by exposure to a young systemic environment,” *Nature*, vol. 433, no. 7027, pp. 760–764, Feb. 2005.
- [216] M. E. Carlson, M. Hsu, and I. M. Conboy, “Imbalance between pSmad3 and Notch induces CDK inhibitors in old muscle stem cells,” *Nature*, vol. 454, no. 7203, pp. 528–532, Jul. 2008.
- [217] C. Elabd, W. Cousin, P. Upadhyayula, R. Y. Chen, M. S. Chooljian, J. Li, S. Kung, K. P. Jiang, and I. M. Conboy, “Oxytocin is an age-specific circulating hormone that is necessary for muscle maintenance and regeneration,” *Nat. Commun.*, vol. 5, p. 4082, 2014.
- [218] S. Fulle, S. Di Donna, C. Puglielli, T. Pietrangelo, S. Beccafico, R. Bellomo, F. Protasi, and G. Fanò, “Age-dependent imbalance of the antioxidative system in human satellite cells,” *Exp. Gerontol.*, vol. 40, no. 3, pp. 189–197, Mar. 2005.
- [219] B. D. Cosgrove, P. M. Gilbert, E. Porpiglia, F. Mourkioti, S. P. Lee, S. Y. Corbel, M. E. Llewellyn, S. L. Delp, and H. M. Blau, “Rejuvenation of the muscle stem cell population restores strength to injured aged muscles,” *Nat. Med.*, vol. 20, no. 3, pp. 255–264, Mar. 2014.
- [220] F. D. Price, J. von Maltzahn, C. F. Bentzinger, N. A. Dumont, H. Yin, N. C. Chang, D. H. Wilson, J. Frenette, and M. A. Rudnicki, “Inhibition of JAK-STAT signaling stimulates adult satellite cell function,” *Nat. Med.*, vol. 20, no. 10, pp. 1174–1181, Oct. 2014.
- [221] M. M. Kushnir, T. Blamires, A. L. Rockwood, W. L. Roberts, B. Yue, E. Erdogan, A. M. Bunker, and A. W. Meikle, “Liquid chromatography-tandem mass spectrometry assay for

- androstenedione, dehydroepiandrosterone, and testosterone with pediatric and adult reference intervals,” *Clin. Chem.*, vol. 56, no. 7, pp. 1138–1147, Jul. 2010.
- [222] K. Aizawa, M. Iemitsu, S. Maeda, N. Mesaki, T. Ushida, and T. Akimoto, “Endurance exercise training enhances local sex steroidogenesis in skeletal muscle,” *Med. Sci. Sports Exerc.*, vol. 43, no. 11, pp. 2072–2080, Nov. 2011.
- [223] G. S. Roth, M. A. Lane, D. K. Ingram, J. A. Mattison, D. Elahi, J. D. Tobin, D. Muller, and E. J. Metter, “Biomarkers of caloric restriction may predict longevity in humans,” *Science*, vol. 297, no. 5582, p. 811, Aug. 2002.
- [224] T. Yokokawa, K. Sato, N. Iwanaka, H. Honda, K. Higashida, M. Iemitsu, T. Hayashi, and T. Hashimoto, “Dehydroepiandrosterone activates AMP kinase and regulates GLUT4 and PGC-1 α expression in C2C12 myotubes,” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 463, no. 1–2, pp. 42–47, Jul. 2015.
- [225] W. L. Baker, S. Karan, and A. M. Kenny, “Effect of dehydroepiandrosterone on muscle strength and physical function in older adults: a systematic review,” *J. Am. Geriatr. Soc.*, vol. 59, no. 6, pp. 997–1002, Jun. 2011.
- [226] J. K. Amory, N. B. Watts, K. A. Easley, P. R. Sutton, B. D. Anawalt, A. M. Matsumoto, W. J. Bremner, and J. L. Tenover, “Exogenous testosterone or testosterone with finasteride increases bone mineral density in older men with low serum testosterone,” *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 89, no. 2, pp. 503–510, Feb. 2004.
- [227] A. M. Traish, F. Saad, and A. Guay, “The dark side of testosterone deficiency: II. Type 2 diabetes and insulin resistance,” *J. Androl.*, vol. 30, no. 1, pp. 23–32, Feb. 2009.
- [228] T. W. Storer, L. Woodhouse, L. Magliano, A. B. Singh, C. Dzekov, J. Dzekov, and S. Bhasin, “Changes in muscle mass, muscle strength, and power but not physical function are related to testosterone dose in healthy older men,” *J. Am. Geriatr. Soc.*, vol. 56, no. 11, pp. 1991–1999, Nov. 2008.
- [229] E. L. Kovacheva, A. P. S. Hikim, R. Shen, I. Sinha, and I. Sinha-Hikim, “Testosterone supplementation reverses sarcopenia in aging through regulation of myostatin, c-Jun NH2-terminal kinase, Notch, and Akt signaling pathways,” *Endocrinology*, vol. 151, no. 2, pp. 628–638, Feb. 2010.
- [230] T. Usui, K. Kajita, T. Kajita, I. Mori, T. Hanamoto, T. Ikeda, H. Okada, K. Taguchi, Y. Kitada, H. Morita, T. Sasaki, T. Kitamura, T. Sato, I. Kojima, and T. Ishizuka, “Elevated mitochondrial biogenesis in skeletal muscle is associated with testosterone-induced body weight loss in male mice,” *FEBS Lett.*, vol. 588, no. 10, pp. 1935–1941, May 2014.
- [231] S. Bhasin, G. R. Cunningham, F. J. Hayes, A. M. Matsumoto, P. J. Snyder, R. S. Swerdloff, V. M. Montori, and Task Force, Endocrine Society, “Testosterone therapy in men with androgen deficiency syndromes: an Endocrine Society clinical practice guideline,” *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 95, no. 6, pp. 2536–2559, Jun. 2010.
- [232] C. Weikert, T. Pischon, and S. Weikert, “Adverse events associated with testosterone administration,” *N. Engl. J. Med.*, vol. 363, no. 19, p. 1865; author reply 1866–1867, Nov. 2010.
- [233] F. Cosman and R. Lindsay, “Selective estrogen receptor modulators: clinical spectrum,” *Endocr. Rev.*, vol. 20, no. 3, pp. 418–434, Jun. 1999.
- [234] D. A. Papanicolaou, S. N. Ather, H. Zhu, Y. Zhou, J. Lutkiewicz, B. B. Scott, and J. Chandler, “A phase IIA randomized, placebo-controlled clinical trial to study the efficacy and safety of the selective androgen receptor modulator (SARM), MK-0773 in female participants with sarcopenia,” *J. Nutr. Health Aging*, vol. 17, no. 6, pp. 533–543, 2013.
- [235] J. T. Dalton, K. G. Barnette, C. E. Bohl, M. L. Hancock, D. Rodriguez, S. T. Dodson, R. A. Morton, and M. S. Steiner, “The selective androgen receptor modulator GTx-024 (enobosarm) improves lean body mass and physical function in healthy elderly men and postmenopausal women: results of a double-blind, placebo-controlled phase II trial,” *J. Cachexia Sarcopenia Muscle*, vol. 2, no. 3, pp. 153–161, Sep. 2011.
- [236] G. Onder, B. W. J. H. Penninx, R. Balkrishnan, L. P. Fried, P. H. M. Chaves, J. Williamson, C. Carter, M. Di Bari, J. M. Guralnik, and M. Pahor, “Relation between use of angiotensin-converting enzyme inhibitors and muscle strength and physical function in

- older women: an observational study," *Lancet Lond. Engl.*, vol. 359, no. 9310, pp. 926–930, Mar. 2002.
- [237] J. E. Fabre, A. Rivard, M. Magner, M. Silver, and J. M. Isner, "Tissue inhibition of angiotensin-converting enzyme activity stimulates angiogenesis in vivo," *Circulation*, vol. 99, no. 23, pp. 3043–3049, Jun. 1999.
- [238] M. Maggio, G. P. Ceda, F. Lauretani, M. Pahor, S. Bandinelli, S. S. Najjar, S. M. Ling, S. Basaria, C. Ruggiero, G. Valenti, and L. Ferrucci, "Relation of angiotensin-converting enzyme inhibitor treatment to insulin-like growth factor-1 serum levels in subjects >65 years of age (the InCHIANTI study)," *Am. J. Cardiol.*, vol. 97, no. 10, pp. 1525–1529, May 2006.
- [239] E. M. V. de Cavanagh, B. Piotrkowski, N. Basso, I. Stella, F. Inserra, L. Ferder, and C. G. Fraga, "Enalapril and losartan attenuate mitochondrial dysfunction in aged rats," *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.*, vol. 17, no. 9, pp. 1096–1098, Jun. 2003.
- [240] C. S. Carter, S. Giovannini, S. Giovaninni, D.-O. Seo, J. DuPree, D. Morgan, H. Y. Chung, H. Lees, M. Daniels, G. B. Hubbard, S. Lee, Y. Ikeno, T. C. Foster, T. W. Buford, and E. Marzetti, "Differential effects of enalapril and losartan on body composition and indices of muscle quality in aged male Fischer 344 × Brown Norway rats," *Age Dordr. Neth.*, vol. 33, no. 2, pp. 167–183, Jun. 2011.
- [241] L. Dössegger, E. Aldor, M. G. Baird, S. Braun, J. G. Cleland, R. Donaldson, L. J. Jansen, M. D. Joy, J. A. Marin-Neto, and E. Nogueira, "Influence of angiotensin converting enzyme inhibition on exercise performance and clinical symptoms in chronic heart failure: a multicentre, double-blind, placebo-controlled trial," *Eur. Heart J.*, vol. 14 Suppl C, pp. 18–23, Jul. 1993.
- [242] N. K. LeBrasseur, T. M. Schelhorn, B. L. Bernardo, P. G. Cosgrove, P. M. Loria, and T. A. Brown, "Myostatin inhibition enhances the effects of exercise on performance and metabolic outcomes in aged mice," *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.*, vol. 64, no. 9, pp. 940–948, Sep. 2009.
- [243] K. T. Murphy, R. Koopman, T. Naim, B. Léger, J. Trieu, C. Ibebunjo, and G. S. Lynch, "Antibody-directed myostatin inhibition in 21-mo-old mice reveals novel roles for myostatin signaling in skeletal muscle structure and function," *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.*, vol. 24, no. 11, pp. 4433–4442, Nov. 2010.
- [244] V. A. Narkar, M. Downes, R. T. Yu, E. Emblar, Y.-X. Wang, E. Banayo, M. M. Mihaylova, M. C. Nelson, Y. Zou, H. Juguilon, H. Kang, R. J. Shaw, and R. M. Evans, "AMPK and PPARdelta agonists are exercise mimetics," *Cell*, vol. 134, no. 3, pp. 405–415, Aug. 2008.
- [245] K. Zarse and M. Ristow, "A mitochondrially encoded hormone ameliorates obesity and insulin resistance," *Cell Metab.*, vol. 21, no. 3, pp. 355–356, Mar. 2015.
- [246] C. Lee, J. Zeng, B. G. Drew, T. Sallam, A. Martin-Montalvo, J. Wan, S.-J. Kim, H. Mehta, A. L. Hevener, R. de Cabo, and P. Cohen, "The mitochondrial-derived peptide MOTS-c promotes metabolic homeostasis and reduces obesity and insulin resistance," *Cell Metab.*, vol. 21, no. 3, pp. 443–454, Mar. 2015.
- [247] B. F. O'Dowd, M. Heiber, A. Chan, H. H. Heng, L. C. Tsui, J. L. Kennedy, X. Shi, A. Petronis, S. R. George, and T. Nguyen, "A human gene that shows identity with the gene encoding the angiotensin receptor is located on chromosome 11," *Gene*, vol. 136, no. 1–2, pp. 355–360, Dec. 1993.
- [248] E. Devic, K. Rizzoti, S. Bodin, B. Knibiehler, and Y. Audigier, "Amino acid sequence and embryonic expression of msr/apj, the mouse homolog of Xenopus X-msr and human APJ," *Mech. Dev.*, vol. 84, no. 1–2, pp. 199–203, Jun. 1999.
- [249] E. Devic, K. Rizzoti, S. Bodin, L. Paquereau, B. Knibiehler, and Y. Audigier, "[Expression of a new family of receptors similar to CXC chemokine receptors in endothelial cell precursors]," *Pathol. Biol. (Paris)*, vol. 47, no. 4, pp. 330–338, Apr. 1999.
- [250] M. Hosoya, Y. Kawamata, S. Fukusumi, R. Fujii, Y. Habata, S. Hinuma, C. Kitada, S. Honda, T. Kurokawa, H. Onda, O. Nishimura, and M. Fujino, "Molecular and functional characteristics of APJ. Tissue distribution of mRNA and interaction with the endogenous ligand apelin," *J. Biol. Chem.*, vol. 275, no. 28, pp. 21061–21067, Jul. 2000.

- [251] D. K. Lee, R. Cheng, T. Nguyen, T. Fan, A. P. Kariyawasam, Y. Liu, D. H. Osmond, S. R. George, and B. F. O'Dowd, "Characterization of apelin, the ligand for the APJ receptor," *J. Neurochem.*, vol. 74, no. 1, pp. 34–41, Jan. 2000.
- [252] K. Tatemoto, M. Hosoya, Y. Habata, R. Fujii, T. Kakegawa, M. X. Zou, Y. Kawamata, S. Fukusumi, S. Hinuma, C. Kitada, T. Kurokawa, H. Onda, and M. Fujino, "Isolation and characterization of a novel endogenous peptide ligand for the human APJ receptor," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 251, no. 2, pp. 471–476, Oct. 1998.
- [253] M. J. Klein and A. P. Davenport, "Emerging roles of apelin in biology and medicine," *Pharmacol. Ther.*, vol. 107, no. 2, pp. 198–211, Aug. 2005.
- [254] M. Reichman-Fried and E. Raz, "Small proteins, big roles: the signaling protein Apela extends the complexity of developmental pathways in the early zebrafish embryo," *BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.*, vol. 36, no. 8, pp. 741–745, Aug. 2014.
- [255] C. Deng, H. Chen, N. Yang, Y. Feng, and A. J. W. Hsueh, "Apela Regulates Fluid Homeostasis by Binding to the APJ Receptor to Activate Gi Signaling," *J. Biol. Chem.*, vol. 290, no. 30, pp. 18261–18268, Jul. 2015.
- [256] A. Pauli, M. L. Norris, E. Valen, G.-L. Chew, J. A. Gagnon, S. Zimmerman, A. Mitchell, J. Ma, J. Dubrulle, D. Reyon, S. Q. Tsai, J. K. Joung, A. Saghatelian, and A. F. Schier, "Toddler: an embryonic signal that promotes cell movement via Apelin receptors," *Science*, vol. 343, no. 6172, p. 1248636, Feb. 2014.
- [257] L. A. O'Donnell, A. Agrawal, P. Sabnekar, M. A. Dichter, D. R. Lynch, and D. L. Kolson, "Apelin, an endogenous neuronal peptide, protects hippocampal neurons against excitotoxic injury," *J. Neurochem.*, vol. 102, no. 6, pp. 1905–1917, Sep. 2007.
- [258] J. J. Maguire, M. J. Klein, S. L. Pitkin, and A. P. Davenport, "[Pyr1]apelin-13 identified as the predominant apelin isoform in the human heart: vasoactive mechanisms and inotropic action in disease," *Hypertension*, vol. 54, no. 3, pp. 598–604, Sep. 2009.
- [259] Y. Kawamata, Y. Habata, S. Fukusumi, M. Hosoya, R. Fujii, S. Hinuma, N. Nishizawa, C. Kitada, H. Onda, O. Nishimura, and M. Fujino, "Molecular properties of apelin: tissue distribution and receptor binding," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1538, no. 2–3, pp. 162–171, Apr. 2001.
- [260] K. Shin, A. Pandey, X.-Q. Liu, Y. Anini, and J. K. Rainey, "Preferential apelin-13 production by the proprotein convertase PCSK3 is implicated in obesity," *FEBS Open Bio*, vol. 3, pp. 328–333, 2013.
- [261] J. Boucher, B. Masri, D. Daviaud, S. Gesta, C. Guigné, A. Mazzucotelli, I. Castan-Laurell, I. Tack, B. Knibiehler, C. Carpené, Y. Audigier, J.-S. Saulnier-Blache, and P. Valet, "Apelin, a newly identified adipokine up-regulated by insulin and obesity," *Endocrinology*, vol. 146, no. 4, pp. 1764–1771, Apr. 2005.
- [262] C. Bertrand, A. Pignalosa, E. Wanecq, C. Rancoule, A. Batut, S. Deleruyelle, L. Lionetti, P. Valet, and I. Castan-Laurell, "Effects of dietary eicosapentaenoic acid (EPA) supplementation in high-fat fed mice on lipid metabolism and apelin/APJ system in skeletal muscle," *PLoS One*, vol. 8, no. 11, p. e78874, 2013.
- [263] M. Azizi, X. Iturrioz, A. Blanchard, S. Peyrard, N. De Mota, N. Chartrel, H. Vaudry, P. Corvol, and C. Llorens-Cortes, "Reciprocal regulation of plasma apelin and vasopressin by osmotic stimuli," *J. Am. Soc. Nephrol. JASN*, vol. 19, no. 5, pp. 1015–1024, May 2008.
- [264] K. S. Chong, R. S. Gardner, J. J. Morton, E. A. Ashley, and T. A. McDonagh, "Plasma concentrations of the novel peptide apelin are decreased in patients with chronic heart failure," *Eur. J. Heart Fail.*, vol. 8, no. 4, pp. 355–360, Jun. 2006.
- [265] X. Iturrioz, R. Gerbier, V. Leroux, R. Alvear-Perez, B. Maigret, and C. Llorens-Cortes, "By interacting with the C-terminal Phe of apelin, Phe255 and Trp259 in helix VI of the apelin receptor are critical for internalization," *J. Biol. Chem.*, vol. 285, no. 42, pp. 32627–32637, Oct. 2010.
- [266] X. Chen, B. Bai, Y. Tian, H. Du, and J. Chen, "Identification of serine 348 on the apelin receptor as a novel regulatory phosphorylation site in apelin-13-induced G protein-independent biased signaling," *J. Biol. Chem.*, vol. 289, no. 45, pp. 31173–31187, Nov. 2014.

- [267] B. Masri, H. Lahlou, H. Mazarguil, B. Knibiehler, and Y. Audigier, "Apelin (65-77) activates extracellular signal-regulated kinases via a PTX-sensitive G protein," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 290, no. 1, pp. 539–545, Jan. 2002.
- [268] C. Dray, C. Knauf, D. Daviaud, A. Waget, J. Boucher, M. Buléon, P. D. Cani, C. Attané, C. Guigné, C. Carpéné, R. Burcelin, I. Castan-Laurell, and P. Valet, "Apelin stimulates glucose utilization in normal and obese insulin-resistant mice," *Cell Metab.*, vol. 8, no. 5, pp. 437–445, Nov. 2008.
- [269] C. Attané, C. Foussal, S. Le Gonidec, A. Benani, D. Daviaud, E. Wanecq, R. Guzmán-Ruiz, C. Dray, V. Bezaire, C. Rancoule, K. Kuba, M. Ruiz-Gayo, T. Levade, J. Penninger, R. Burcelin, L. Pénicaud, P. Valet, and I. Castan-Laurell, "Apelin treatment increases complete Fatty Acid oxidation, mitochondrial oxidative capacity, and biogenesis in muscle of insulin-resistant mice," *Diabetes*, vol. 61, no. 2, pp. 310–320, Feb. 2012.
- [270] B. Masri, N. Morin, M. Cornu, B. Knibiehler, and Y. Audigier, "Apelin (65-77) activates p70 S6 kinase and is mitogenic for umbilical endothelial cells," *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.*, vol. 18, no. 15, pp. 1909–1911, Dec. 2004.
- [271] M. C. Scimia, C. Hurtado, S. Ray, S. Metzler, K. Wei, J. Wang, C. E. Woods, N. H. Purcell, D. Catalucci, T. Akasaka, O. F. Bueno, G. P. Vlasuk, P. Kaliman, R. Bodmer, L. H. Smith, E. Ashley, M. Mercola, J. H. Brown, and P. Ruiz-Lozano, "APJ acts as a dual receptor in cardiac hypertrophy," *Nature*, vol. 488, no. 7411, pp. 394–398, Aug. 2012.
- [272] C. Chaves-Almagro, I. Castan-Laurell, C. Dray, C. Knauf, P. Valet, and B. Masri, "Apelin receptors: From signaling to antidiabetic strategy," *Eur. J. Pharmacol.*, May 2015.
- [273] A.-M. O'Carroll and S. J. Lolait, "Regulation of rat APJ receptor messenger ribonucleic acid expression in magnocellular neurones of the paraventricular and supraoptic nuclei by osmotic stimuli," *J. Neuroendocrinol.*, vol. 15, no. 7, pp. 661–666, Jul. 2003.
- [274] K. J. Clarke, K. W. Whitaker, and T. M. Reyes, "Diminished metabolic responses to centrally-administered apelin-13 in diet-induced obese rats fed a high-fat diet," *J. Neuroendocrinol.*, vol. 21, no. 2, pp. 83–89, Feb. 2009.
- [275] A.-M. O'Carroll, S. J. Lolait, and G. M. Howell, "Transcriptional regulation of the rat apelin receptor gene: promoter cloning and identification of an Sp1 site necessary for promoter activity," *J. Mol. Endocrinol.*, vol. 36, no. 1, pp. 221–235, Feb. 2006.
- [276] C. Vickers, P. Hales, V. Kaushik, L. Dick, J. Gavin, J. Tang, K. Godbout, T. Parsons, E. Baronas, F. Hsieh, S. Acton, M. Patane, A. Nichols, and P. Tummino, "Hydrolysis of biological peptides by human angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase," *J. Biol. Chem.*, vol. 277, no. 17, pp. 14838–14843, Apr. 2002.
- [277] E. Ceraudo, C. Galanth, E. Carpentier, I. Banegas-Font, A.-M. Schonegge, R. Alvear-Perez, X. Iturrioz, M. Bouvier, and C. Llorens-Cortés, "Biased signaling favoring gi over β -arrestin promoted by an apelin fragment lacking the C-terminal phenylalanine," *J. Biol. Chem.*, vol. 289, no. 35, pp. 24599–24610, Aug. 2014.
- [278] T. Sato, T. Suzuki, H. Watanabe, A. Kadowaki, A. Fukamizu, P. P. Liu, A. Kimura, H. Ito, J. M. Penninger, Y. Imai, and K. Kuba, "Apelin is a positive regulator of ACE2 in failing hearts," *J. Clin. Invest.*, vol. 123, no. 12, pp. 5203–5211, Dec. 2013.
- [279] N. De Mota, Z. Lenkei, and C. Llorens-Cortés, "Cloning, pharmacological characterization and brain distribution of the rat apelin receptor," *Neuroendocrinology*, vol. 72, no. 6, pp. 400–407, Dec. 2000.
- [280] G. Földes, F. Horkay, I. Szokodi, O. Vuolteenaho, M. Ilves, K. A. Lindstedt, M. Mäyränpää, B. Sárman, L. Seres, R. Skoumal, Z. Lakó-Futó, R. deChâtel, H. Ruskoaho, and M. Tóth, "Circulating and cardiac levels of apelin, the novel ligand of the orphan receptor APJ, in patients with heart failure," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 308, no. 3, pp. 480–485, Aug. 2003.
- [281] A. G. Japp and D. E. Newby, "The apelin-APJ system in heart failure: pathophysiologic relevance and therapeutic potential," *Biochem. Pharmacol.*, vol. 75, no. 10, pp. 1882–1892, May 2008.
- [282] V.-P. Ronkainen, J. J. Ronkainen, S. L. Hänninen, H. Leskinen, J. L. Ruas, T. Pereira, L. Poellinger, O. Vuolteenaho, and P. Tavi, "Hypoxia inducible factor regulates the cardiac

- expression and secretion of apelin," *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.*, vol. 21, no. 8, pp. 1821–1830, Jun. 2007.
- [283] A. Besse-Patin, E. Montastier, C. Vinel, I. Castan-Laurell, K. Louche, C. Dray, D. Daviaud, L. Mir, M.-A. Marques, C. Thalamas, P. Valet, D. Langin, C. Moro, and N. Viguerie, "Effect of endurance training on skeletal muscle myokine expression in obese men: identification of apelin as a novel myokine," *Int. J. Obes. 2005*, vol. 38, no. 5, pp. 707–713, May 2014.
- [284] Y. Yang, X. Zhang, H. Cui, C. Zhang, C. Zhu, and L. Li, "Apelin-13 protects the brain against ischemia/reperfusion injury through activating PI3K/Akt and ERK1/2 signaling pathways," *Neurosci. Lett.*, vol. 568, pp. 44–49, May 2014.
- [285] K. Jeong, Y. Oh, S.-J. Kim, H. Kim, K.-C. Park, S. S. Kim, J. Ha, I. Kang, and W. Choe, "Apelin is transcriptionally regulated by ER stress-induced ATF4 expression via a p38 MAPK-dependent pathway," *Apoptosis Int. J. Program. Cell Death*, vol. 19, no. 9, pp. 1399–1410, Sep. 2014.
- [286] I. Szokodi, P. Tavi, G. Földes, S. Voutilainen-Myllylä, M. Ilves, H. Tokola, S. Pikkarainen, J. Piuholta, J. Rysä, M. Tóth, and H. Ruskoaho, "Apelin, the novel endogenous ligand of the orphan receptor APJ, regulates cardiac contractility," *Circ. Res.*, vol. 91, no. 5, pp. 434–440, Sep. 2002.
- [287] K. Kuba, L. Zhang, Y. Imai, S. Arab, M. Chen, Y. Maekawa, M. Leschnik, A. Leibbrandt, M. Markovic, M. Makovic, J. Schwaighofer, N. Beetz, R. Musialek, G. G. Neely, V. Komnenovic, U. Kolm, B. Metzler, R. Ricci, H. Hara, A. Meixner, M. Nghiem, X. Chen, F. Dawood, K. M. Wong, R. Sarao, E. Cukerman, A. Kimura, L. Hein, J. Thalhammer, P. P. Liu, and J. M. Penninger, "Impaired heart contractility in Apelin gene-deficient mice associated with aging and pressure overload," *Circ. Res.*, vol. 101, no. 4, pp. e32–42, Aug. 2007.
- [288] K. Tatemoto, K. Takayama, M. X. Zou, I. Kumaki, W. Zhang, K. Kumano, and M. Fujimiya, "The novel peptide apelin lowers blood pressure via a nitric oxide-dependent mechanism," *Regul. Pept.*, vol. 99, no. 2–3, pp. 87–92, Jun. 2001.
- [289] A. G. Japp, N. L. Cruden, D. A. B. Amer, V. K. Y. Li, E. B. Goudie, N. R. Johnston, S. Sharma, I. Neilson, D. J. Webb, I. L. Megson, A. D. Flapan, and D. E. Newby, "Vascular effects of apelin in vivo in man," *J. Am. Coll. Cardiol.*, vol. 52, no. 11, pp. 908–913, Sep. 2008.
- [290] R. Rastaldo, S. Cappello, A. Folino, G. N. Berta, A. E. Sprio, G. Losano, M. Samaja, and P. Pagliaro, "Apelin-13 limits infarct size and improves cardiac postischemic mechanical recovery only if given after ischemia," *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, vol. 300, no. 6, pp. H2308–2315, Jun. 2011.
- [291] J. C. Simpkin, D. M. Yellon, S. M. Davidson, S. Y. Lim, A. M. Wynne, and C. C. T. Smith, "Apelin-13 and apelin-36 exhibit direct cardioprotective activity against ischemia-reperfusion injury," *Basic Res. Cardiol.*, vol. 102, no. 6, pp. 518–528, Nov. 2007.
- [292] D. J. Hausenloy and D. M. Yellon, "Preconditioning and postconditioning: united at reperfusion," *Pharmacol. Ther.*, vol. 116, no. 2, pp. 173–191, Nov. 2007.
- [293] M. Saint-Geniez, C. B. Argence, B. Knibiehler, and Y. Audigier, "The *msr/apj* gene encoding the apelin receptor is an early and specific marker of the venous phenotype in the retinal vasculature," *Gene Expr. Patterns GEP*, vol. 3, no. 4, pp. 467–472, Aug. 2003.
- [294] S. Rayalam, M. A. Della-Fera, T. Kasser, W. Warren, and C. A. Baile, "Emerging role of apelin as a therapeutic target in cancer: a patent review," *Recent Patents Anticancer Drug Discov.*, vol. 6, no. 3, pp. 367–372, Sep. 2011.
- [295] T. Duparc, A. Colom, P. D. Cani, N. Massaly, S. Rastrelli, A. Drougard, S. Le Gonidec, L. Moulédous, B. Frances, I. Leclercq, C. Llorens-Cortes, J. A. Pospisilik, N. M. Delzenne, P. Valet, I. Castan-Laurell, and C. Knauf, "Central apelin controls glucose homeostasis via a nitric oxide-dependent pathway in mice," *Antioxid. Redox Signal.*, vol. 15, no. 6, pp. 1477–1496, Sep. 2011.
- [296] A. Drougard, T. Duparc, X. Brenachot, L. Carneiro, A. Gouazé, A. Fournel, L. Geurts, T. Cadoudal, A.-C. Prats, L. Pénicaud, D. Vieau, J. Lesage, C. Leloup, A. Benani, P. D. Cani, P. Valet, and C. Knauf, "Hypothalamic apelin/reactive oxygen species signaling

- controls hepatic glucose metabolism in the onset of diabetes,” *Antioxid. Redox Signal.*, vol. 20, no. 4, pp. 557–573, Feb. 2014.
- [297] S. Taheri, K. Murphy, M. Cohen, E. Sujkovic, A. Kennedy, W. Dhillon, C. Dakin, A. Sajedi, M. Ghatei, and S. Bloom, “The effects of centrally administered apelin-13 on food intake, water intake and pituitary hormone release in rats,” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 291, no. 5, pp. 1208–1212, Mar. 2002.
- [298] A. Reaux, N. De Mota, I. Skultetyova, Z. Lenkei, S. El Messari, K. Gallatz, P. Corvol, M. Palkovits, and C. Llorens-Cortès, “Physiological role of a novel neuropeptide, apelin, and its receptor in the rat brain,” *J. Neurochem.*, vol. 77, no. 4, pp. 1085–1096, May 2001.
- [299] N. De Mota, A. Reaux-Le Goazigo, S. El Messari, N. Chartrel, D. Roesch, C. Dujardin, C. Kordon, H. Vaudry, F. Moos, and C. Llorens-Cortes, “Apelin, a potent diuretic neuropeptide counteracting vasopressin actions through inhibition of vasopressin neuron activity and vasopressin release,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 101, no. 28, pp. 10464–10469, Jul. 2004.
- [300] A. Reaux-Le Goazigo, A. Morinville, A. Burlet, C. Llorens-Cortes, and A. Beaudet, “Dehydration-induced cross-regulation of apelin and vasopressin immunoreactivity levels in magnocellular hypothalamic neurons,” *Endocrinology*, vol. 145, no. 9, pp. 4392–4400, Sep. 2004.
- [301] X. J. Zeng, S. P. Yu, L. Zhang, and L. Wei, “Neuroprotective effect of the endogenous neural peptide apelin in cultured mouse cortical neurons,” *Exp. Cell Res.*, vol. 316, no. 11, pp. 1773–1783, Jul. 2010.
- [302] N. Xu, H. Wang, L. Fan, and Q. Chen, “Supraspinal administration of apelin-13 induces antinociception via the opioid receptor in mice,” *Peptides*, vol. 30, no. 6, pp. 1153–1157, Jun. 2009.
- [303] C. Dray, Y. Sakar, C. Vinel, D. Daviaud, B. Masri, L. Garrigues, E. Wanecq, S. Galvani, A. Negre-Salvayre, L. S. Barak, B. Monsarrat, O. Burlet-Schiltz, P. Valet, I. Castan-Laurell, and R. Ducroc, “The intestinal glucose-apelin cycle controls carbohydrate absorption in mice,” *Gastroenterology*, vol. 144, no. 4, pp. 771–780, Apr. 2013.
- [304] I. Castan-Laurell, C. Dray, C. Knauf, O. Kunduzova, and P. Valet, “Apelin, a promising target for type 2 diabetes treatment?,” *Trends Endocrinol. Metab. TEM*, vol. 23, no. 5, pp. 234–241, May 2012.
- [305] T. Yamamoto, Y. Habata, Y. Matsumoto, Y. Yasuhara, T. Hashimoto, H. Hamajyo, H. Anayama, R. Fujii, H. Fuse, Y. Shintani, and M. Mori, “Apelin-transgenic mice exhibit a resistance against diet-induced obesity by increasing vascular mass and mitochondrial biogenesis in skeletal muscle,” *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1810, no. 9, pp. 853–862, Sep. 2011.
- [306] F. Sanchis-Gomar, R. Alis, E. Rampinini, A. Bosio, D. Ferioli, A. La Torre, J. Xu, V. Sansoni, S. Perego, M. Romagnoli, and G. Lombardi, “Adropin and apelin fluctuations throughout a season in professional soccer players: Are they related with performance?,” *Peptides*, vol. 70, pp. 32–36, Aug. 2015.
- [307] H. Yang, L. Zhao, J. Zhang, C.-S. Tang, Y.-F. Qi, and J. Zhang, “Effect of Treadmill Running on Apelin and APJ Expression in Adipose Tissue and Skeletal Muscle in Rats Fed a High-fat Diet,” *Int. J. Sports Med.*, vol. 36, no. 7, pp. 535–541, Jun. 2015.
- [308] K. Higuchi, T. Masaki, K. Gotoh, S. Chiba, I. Katsuragi, K. Tanaka, T. Kakuma, and H. Yoshimatsu, “Apelin, an APJ receptor ligand, regulates body adiposity and favors the messenger ribonucleic acid expression of uncoupling proteins in mice,” *Endocrinology*, vol. 148, no. 6, pp. 2690–2697, Jun. 2007.
- [309] T. Jiang, Y.-D. Zhang, J.-S. Zhou, X.-C. Zhu, Y.-Y. Tian, H.-D. Zhao, H. Lu, Q. Gao, L. Tan, and J.-T. Yu, “Angiotensin-(1-7) is Reduced and Inversely Correlates with Tau Hyperphosphorylation in Animal Models of Alzheimer’s Disease,” *Mol. Neurobiol.*, Jun. 2015.
- [310] X. Xie, X. Xudong, J. Chen, C. Junzhu, X. Wang, W. Xingxiang, F. Zhang, Z. Furong, Y. Liu, and L. Yanrong, “Age- and gender-related difference of ACE2 expression in rat lung,” *Life Sci.*, vol. 78, no. 19, pp. 2166–2171, Apr. 2006.

- [311] C. Riquelme, M. J. Acuña, J. Torrejón, D. Rebolledo, D. Cabrera, R. A. Santos, and E. Brandan, "ACE2 is augmented in dystrophic skeletal muscle and plays a role in decreasing associated fibrosis," *PLoS One*, vol. 9, no. 4, p. e93449, 2014.
- [312] M. J. Kleinz, J. N. Skepper, and A. P. Davenport, "Immunocytochemical localisation of the apelin receptor, APJ, to human cardiomyocytes, vascular smooth muscle and endothelial cells," *Regul. Pept.*, vol. 126, no. 3, pp. 233–240, Mar. 2005.
- [313] A. L. Edinger, T. L. Hoffman, M. Sharron, B. Lee, Y. Yi, W. Choe, D. L. Kolson, B. Mitrovic, Y. Zhou, D. Faulds, R. G. Collman, J. Hesselgesser, R. Horuk, and R. W. Doms, "An orphan seven-transmembrane domain receptor expressed widely in the brain functions as a coreceptor for human immunodeficiency virus type 1 and simian immunodeficiency virus," *J. Virol.*, vol. 72, no. 10, pp. 7934–7940, Oct. 1998.
- [314] K. Narasimhan, "Quantifying motor neuron loss in ALS," *Nat. Neurosci.*, vol. 9, no. 3, p. 304, Mar. 2006.
- [315] C. S. Fry, J. D. Lee, J. Mula, T. J. Kirby, J. R. Jackson, F. Liu, L. Yang, C. L. Mendias, E. E. Dupont-Versteegden, J. J. McCarthy, and C. A. Peterson, "Inducible depletion of satellite cells in adult, sedentary mice impairs muscle regenerative capacity without affecting sarcopenia," *Nat. Med.*, vol. 21, no. 1, pp. 76–80, Jan. 2015.
- [316] C. Bonnard, A. Durand, S. Peyrol, E. Chanseau, M.-A. Chauvin, B. Morio, H. Vidal, and J. Rieusset, "Mitochondrial dysfunction results from oxidative stress in the skeletal muscle of diet-induced insulin-resistant mice," *J. Clin. Invest.*, vol. 118, no. 2, pp. 789–800, Feb. 2008.
- [317] V. Bezaire, C. R. Bruce, G. J. F. Heigenhauser, N. N. Tandon, J. F. C. Glatz, J. J. J. F. Luiken, A. Bonen, and L. L. Spriet, "Identification of fatty acid translocase on human skeletal muscle mitochondrial membranes: essential role in fatty acid oxidation," *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, vol. 290, no. 3, pp. E509–515, Mar. 2006.
- [318] W. Zheng, S. Ren, and J. H. Graziano, "Manganese inhibits mitochondrial aconitase: a mechanism of manganese neurotoxicity," *Brain Res.*, vol. 799, no. 2, pp. 334–342, Jul. 1998.
- [319] C. G. Carlson, J. Rutter, C. Bledsoe, R. Singh, H. Hoff, K. Bruemmer, J. Sesti, F. Gatti, J. Berge, and L. McCarthy, "A simple protocol for assessing inter-trial and inter-examiner reliability for two noninvasive measures of limb muscle strength," *J. Neurosci. Methods*, vol. 186, no. 2, pp. 226–230, Feb. 2010.
- [320] E. Mouisel, K. Relizani, L. Mille-Hamard, R. Denis, C. Hourdé, O. Agbulut, K. Patel, L. Arandel, S. Morales-Gonzalez, A. Vignaud, L. Garcia, A. Ferry, S. Luquet, V. Billat, R. Ventura-Clapier, M. Schuelke, and H. Amthor, "Myostatin is a key mediator between energy metabolism and endurance capacity of skeletal muscle," *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, vol. 307, no. 4, pp. R444–454, Aug. 2014.
- [321] L. Lukjanenko, S. Brachat, E. Pierrel, E. Lach-Trifilieff, and J. N. Feige, "Genomic profiling reveals that transient adipogenic activation is a hallmark of mouse models of skeletal muscle regeneration," *PLoS One*, vol. 8, no. 8, p. e71084, 2013.
- [322] I. Carrié, G. A. van Kan, S. Gillette-Guyonnet, S. Andrieu, J.-F. Dartigues, J. Touchon, T. Dantoine, O. Rouaud, M. Bonnefoy, P. Robert, M.-N. Cuffi, L. Bories, S. Bordes, Y. Gasnier, F. Desclaux, K. Sudres, A. Pesce, and B. Vellas, "Recruitment strategies for preventive trials. The MAPT study (MultiDomain Alzheimer Preventive Trial)," *J. Nutr. Health Aging*, vol. 16, no. 4, pp. 355–359, Apr. 2012.
- [323] A. B. Newman, V. Kupelian, M. Visser, E. Simonsick, B. Goodpaster, M. Nevitt, S. B. Kritchevsky, F. A. Tylavsky, S. M. Rubin, T. B. Harris, and Health ABC Study Investigators, "Sarcopenia: alternative definitions and associations with lower extremity function," *J. Am. Geriatr. Soc.*, vol. 51, no. 11, pp. 1602–1609, Nov. 2003.
- [324] K. M. Sink, M. A. Espeland, C. M. Castro, T. Church, R. Cohen, J. A. Dodson, J. Guralnik, H. C. Hendrie, J. Jennings, J. Katula, O. L. Lopez, M. M. McDermott, M. Pahor, K. F. Reid, J. Rushing, J. Verghese, S. Rapp, J. D. Williamson, and LIFE Study Investigators, "Effect of a 24-Month Physical Activity Intervention vs Health Education on Cognitive

Outcomes in Sedentary Older Adults: The LIFE Randomized Trial,” *JAMA*, vol. 314, no. 8, pp. 781–790, Aug. 2015.

- [325] J. H. Silverstein, M. Timberger, D. L. Reich, and S. Uysal, “Central nervous system dysfunction after noncardiac surgery and anesthesia in the elderly,” *Anesthesiology*, vol. 106, no. 3, pp. 622–628, Mar. 2007.
- [326] A. R. Fidalgo, M. Cibelli, J. P. M. White, I. Nagy, F. Noormohamed, L. Benzonana, M. Maze, and D. Ma, “Peripheral orthopaedic surgery down-regulates hippocampal brain-derived neurotrophic factor and impairs remote memory in mouse,” *Neuroscience*, vol. 190, pp. 194–199, Sep. 2011.
- [327] H.-J. He, Y. Wang, Y. Le, K.-M. Duan, X.-B. Yan, Q. Liao, Y. Liao, J.-B. Tong, N. Terrando, and W. Ouyang, “Surgery upregulates high mobility group box-1 and disrupts the blood-brain barrier causing cognitive dysfunction in aged rats,” *CNS Neurosci. Ther.*, vol. 18, no. 12, pp. 994–1002, Dec. 2012.
- [328] A. D. Medhurst, C. A. Jennings, M. J. Robbins, R. P. Davis, C. Ellis, K. Y. Winborn, K. W. M. Lawrie, G. Hervieu, G. Riley, J. E. Bolaky, N. C. Herrity, P. Murdock, and J. G. Darker, “Pharmacological and immunohistochemical characterization of the APJ receptor and its endogenous ligand apelin,” *J. Neurochem.*, vol. 84, no. 5, pp. 1162–1172, Mar. 2003.
- [329] G. D. Ferguson and D. R. Storm, “Why calcium-stimulated adenylyl cyclases?,” *Physiol. Bethesda Md*, vol. 19, pp. 271–276, Oct. 2004.

RESUME

Le vieillissement de la population est un phénomène universel dont l'amélioration des conditions de vie est la principale cause. Cependant, dans 20% des cas, l'avancée en âge s'accompagne aussi d'une perte de l'autonomie qui nécessite une prise en charge institutionnelle lourde pour le patient et la société. Une des principales causes de cette transition fragilité/dépendance réside dans la diminution dramatique de la masse et de la fonction musculaire, aussi appelée sarcopénie. Dans ce contexte, il devient primordial de mieux caractériser cette pathologie afin de mettre au point de nouvelles stratégies thérapeutiques. Dans cette optique, nous nous sommes intéressés à l'apeline, un peptide endogène circulant, dont le rôle favorable sur le métabolisme énergétique du muscle squelettique a été mis en évidence au sein du laboratoire dans un contexte d'obésité. **A partir de ces précédents résultats nous avons donc émis l'hypothèse d'un rôle bénéfique de l'apeline sur la physiologie du tissu musculaire au cours du vieillissement.**

Dans un premier temps, nous avons démontré que la contraction du muscle strié squelettique *in vitro* et *in vivo* chez la souris et l'homme, génère une production et une sécrétion musculaire d'apeline. Cette régulation par l'exercice physique est apparue altérée chez les souris âgées, et ceci s'accompagne d'une diminution des taux d'apeline plasmatiques chez la souris, comme chez l'individu âgé. De plus, nous avons pu démontrer, chez l'homme âgé pratiquant un exercice chronique, l'existence d'une corrélation entre les capacités d'augmentation de l'apelinémie et l'efficacité de l'exercice en termes de force physique.

Parallèlement, nous avons pu mettre en évidence une augmentation significative de la masse et de la fonction musculaire de souris âgées suite à une supplémentation (pharmacologique ou génique) chronique en apeline. Ces effets s'expliquent en partie par l'activation du métabolisme énergétique des fibres musculaires, nécessitant l'activation de l'axe AMPK-PGC1 α qui permet une potentialisation de la biogénèse mitochondriale. D'autre part, des expériences de régénération musculaire démontrent que l'apeline est également capable d'activer les cellules satellites, cellules souches résidentes du muscle squelettique.

Au cœur de différentes approches (prédictive, préventive et thérapeutique), l'apeline s'inscrit dans un nouvel axe de recherche quant à la détection (biomarqueur) et la prise en charge (traitement pharmacologique) des faiblesses musculaires associées au vieillissement.