



# **Altération de la régénération musculaire dans la Maladie Pulmonaire Obstructive Chronique**

**Thèse**

**Marie-Eve Thériault**

**Doctorat en médecine expérimentale**  
Philosophiae doctor (Ph.D.)

Québec, Canada

© Marie-Eve Thériault, 2016

# **Altération de la régénération musculaire dans la Maladie Pulmonaire Obstructive Chronique**

**Thèse**

**Marie-Eve Thériault**

Sous la direction de :

Richard Debigaré, directeur de recherche  
François Maltais, codirecteur de recherche

# Résumé

## ALTÉRATION DE LA RÉGÉNÉRATION MUSCULAIRE DANS LA MALADIE PULMONAIRE OBSTRUCTIVE CHRONIQUE

La maladie pulmonaire obstructive chronique (MPOC) est caractérisée par une obstruction bronchique irréversible et progressive. L'atrophie musculaire périphérique y est fréquente et a un impact négatif sur la capacité fonctionnelle et la survie des sujets atteints. Toutefois, on ignore si une altération du processus de régénération musculaire est un processus ayant cours dans l'atrophie musculaire périphérique. Le but de la présente thèse était donc d'étudier les cellules satellites, principales cellules responsables de la régénération musculaire dans les muscles périphériques de patients ayant une MPOC.

Dans un premier temps, nous avons évalué l'historique de réplication du tissu musculaire et la sénescence des cellules satellites. Les changements morphologiques ayant lieu dans le muscle au cours de la progression de la maladie rendent le muscle plus susceptible aux dommages, induisant un raccourcissement prématuré des télomères. Un raccourcissement des télomères chez les sujets ayant une MPOC avec atrophie est concomitant avec une augmentation du nombre de cellules satellites sénescents et de l'épuisement du potentiel de régénération compromettant le maintien de la masse musculaire chez ces sujets.

Dans un deuxième et troisième temps, nous avons étudié les étapes amenant une cellule satellite vers une cellule musculaire dans les muscles périphériques et respiratoires de patients ayant une MPOC comparativement à des sujets contrôles. Les cellules satellites sont impliquées dans la réparation du tissu musculaire. Dans les cellules satellites provenant des sujets ayant une MPOC, une altération de la prolifération et de la différenciation a été observée. Ces résultats sont compatibles avec une

altération de la régénération musculaire pouvant conduire à l'atrophie musculaire dans la MPOC.

Le quatrième volet de ce projet s'intéressait à l'impact d'un entraînement en résistance sur l'activité des cellules satellites et le rôle joué par la myostatine dans ce contexte. La littérature montre que l'exercice en résistance est bien toléré et aide les patients ayant une MPOC à retrouver une meilleure qualité de vie. Cependant, il semble qu'ils n'y répondent pas tous aussi bien que les sujets contrôles. La capacité de réponse des cellules satellites à un entraînement en résistance semble inadéquate, suggérant ainsi un défaut de leur activation.

Dans la dernière étude de cette thèse, nous avons voulu évaluer l'impact de l'inflammation systémique en étudiant SAA1, une protéine de phase aiguë et p21, une protéine du cycle cellulaire dans la dégradation des protéines des cellules musculaires. Les liens de causalité entre l'affection primaire et les différentes comorbidités demeurent nébuleux dans la MPOC. SAA1 et p21 sont augmentés dans les muscles squelettiques des patients ayant une MPOC et par ailleurs, SAA1 est capable d'induire la dégradation des protéines musculaires.

Cette thèse expose les premiers éléments impliquant l'altération de la régénération musculaire avec la dysfonction musculaire observée chez les patients ayant une MPOC. Ces résultats vont certainement contribuer au développement de nouvelles thérapies et stratégies d'intervention dans le but d'améliorer la qualité de vie des personnes atteintes d'une MPOC. En somme, les travaux effectués dans le cadre de la présente thèse montrent que plusieurs mécanismes agissent de concert avec l'inactivité physique afin d'induire le phénotype dysfonctionnel dans les muscles des patients ayant une MPOC.



# **Abstract**

## **Skeletal muscle regeneration is altered in skeletal muscles of patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease.**

Chronic Obstructive Pulmonary Disease is associated with an irreversible and a progressive airflow obstruction. In COPD, the loss of muscle mass has a significant impact on quality of life and is associated with premature death. Many biochemical factors have been proposed to trigger and perpetuate the skeletal muscle atrophy in COPD.

The maintenance of peripheral muscle mass may be compromised in patients with COPD due to premature cellular senescence and exhaustion of the regenerative potential of the muscles. Shortening of telomeres in patients with COPD is consistent with an increased number of senescent satellite cells and an exhausted muscle regenerative capacity, compromising the maintenance of muscle mass in these individuals.

Muscle mass maintenance relies on the delicate regulation between protein degradation, synthesis and the addition of new myonuclei from satellite cells. Comparing the signalisation involved in the skeletal muscle regeneration between two muscles with different levels of activation within the same subjects is an interesting strategy to evaluate the impact of local versus systemic factors in the regulation of skeletal muscle regeneration. Impaired satellite cell activation, proliferation and differentiation affecting skeletal muscle regeneration could contribute to the progression of muscle dysfunction in patients with COPD.

Resistance training, as provided in pulmonary rehabilitation, is an essential tool to promote muscle hypertrophy and increase muscle strength. However, hypertrophic response to resistance training is heterogeneous in patients with COPD. Failure in satellite cell function can lead to delayed,

impaired or failed recovery after muscle injury, and such failures become increasingly prominent in cases of progressive muscle disease.

Although the inflammatory response has been linked to the initiation and development of muscle atrophy, discrepancies exist in the literature concerning the presence and the nature of systemic and/or local inflammatory response in patients with COPD. This inflammation could be linked to the skeletal muscle protein imbalance and ultimately atrophy. The quest to identify a key inflammatory factor that could orchestrate the signaling cascade involved in contractile protein synthesis/degradation or even tissue renewal in peripheral muscles of patients with COPD is of major importance for future direction in this research field.

This thesis demonstrates for the first time the role played by satellite cells in muscle atrophy associated with COPD. Better knowledge of the regenerative capacity in the context of COPD will enhance the understanding of the atrophying process and deepen the reasoning on training interventions in this population.

# Table des matières

Résumé.....	iii
Abstract.....	v
Table des matières.....	vii
Liste des tableaux.....	xii
Liste des figures.....	xiv
Liste des abréviations.....	xix
Remerciements.....	xxi
Avant-propos.....	xxii
Liste des publications.....	xxiii
Chapitre 1: Introduction générale.....	2
Section 1.1 Maladie Pulmonaire Obstructive Chronique.....	2
1.1.1 Généralités.....	2
1.1.2 Épidémiologie.....	4
1.1.3 Étiologie.....	5
1.1.3.1 Facteurs intrinsèques.....	6
1.1.3.2 Facteurs extrinsèques.....	9
1.1.4 Physiopathologie.....	10
1.1.4.1 Inflammation.....	12
1.1.4.2 Déséquilibre protéases/antiprotéases.....	14
1.1.4.3 Stress oxydatifs.....	15
1.1.5 Traitements.....	16
1.1.6 Effets systémiques associées à la MPOC.....	18
1.1.7 Dysfonction musculaire.....	20
Section 1.2 Atrophie musculaire périphérique dans la MPOC.....	22
1.2.1 Voies de signalisation impliquées dans la synthèse et la dégradation des protéines musculaires.....	23
1.2.1.1 Synthèse protéique.....	23
1.2.1.2 Dégradation protéique.....	24

1.2.1.3 <i>Synthèse/dégradation des protéines dans le muscle des patients ayant une MPOC</i> .....	26
1.2.2 Inactivité chronique .....	27
1.2.3 Déficit énergétique .....	28
1.2.4 Stress oxydatif/inflammation .....	29
1.2.5 Déficit hormonal .....	33
1.2.6 Hypoxémie .....	34
1.2.7 Régénération musculaire .....	35
Section 1.3 Cellules satellites.....	37
1.3.1 Muscle squelettique .....	37
1.3.2 Généralités.....	38
1.3.3 Formation.....	40
1.3.4 Activation .....	42
1.3.4.1 <i>Signaux d'activation</i> .....	43
1.3.4.2 <i>Myogenèse</i> .....	46
1.3.5 Implication de la régénération musculaire dans l'atrophie musculaire.....	50
1.3.5.1 <i>Altération des capacités intrinsèques des cellules satellites</i> ...	50
1.3.5.2 <i>Environnement des cellules satellites</i> .....	53
1.3.5.3 <i>Altération des voies de signalisation spécifiques aux cellules satellites</i> .....	54
1.3.5.4 <i>Augmentation de l'apoptose cellulaire</i> .....	55
1.3.5.5 <i>Sénescence répllicative des cellules satellites</i> .....	56
Chapitre 2: Objectifs et hypothèses de recherches .....	60
2.1 Objectifs et hypothèses de recherche .....	60
Chapitre 3: Satellite cells senescence in limb muscle of severe patients with COPD .....	71
3.1 Mise en contexte et contribution des auteurs .....	71
3.2 Résumé.....	72
3.3 Page titre.....	74
3.4 Abstract.....	75
3.5 Introduction .....	76

3.6 Materiel and Methods .....	78
3.7 Results.....	83
3.8 Discussion .....	85
3.9 Acknowledgements .....	90
3.11 Tables.....	98
3.12 Figure legends.....	100
3.13 Figures.....	102
Chapitre 4: Regenerative defect in the <i>vastus lateralis</i> of patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease .....	106
4.1 Mise en contexte et contribution des auteurs .....	106
4.2 Résumé .....	107
4.3 Page titre .....	108
4.4 Abstract .....	109
4.5 Introduction.....	110
4.6 Materiel and Methods .....	112
4.7 Results.....	117
4.8 Discussion .....	121
4.9 Acknowledgements .....	127
4.10 References .....	128
4.11 Tables.....	135
4.12 Figure legends.....	138
4.13 Figures.....	140
Chapitre 5: Effect of an acute bout of resistance training on satellite cells and myostatin activities in patients with COPD.....	148
5.1 Mise en contexte et contribution des auteurs .....	148
5.2 Résumé .....	149
5.3 Page titre .....	150
5.4 Abstract .....	151
5.5 Introduction.....	152
5.6 Materiel and Methods .....	155
5.7 Results.....	159

5.8 Discussion.....	163
5.9 Acknowledgements.....	169
5.10 References.....	170
5.11 Tables.....	179
5.12 Figure legends.....	183
5.13 Figures.....	186
Chapitre 6: Comparative assessments of the regenerative activity in peripheral and respiratory skeletal muscle of patient with COPD. ....	
	193
6.1 Mise en contexte et contribution des auteurs.....	193
6.2 Résumé.....	195
6.3 Page titre.....	197
6.4 Abstract.....	198
6.5 Introduction.....	200
6.6 Materiel and Methods.....	203
6.7 Results.....	208
6.8 Discussion.....	212
6.9 Acknowledgements.....	217
6.10 References.....	218
6.11 Tables.....	226
6.12 Figure legends.....	227
6.13 Figures.....	229
Chapitre 7: Relationship between the induction of Serum amyloid A1 (SAA1) and p21 in COPD and muscle protein breakdown: a link with the inflammatory response?.....	
	237
7.1 Mise en contexte et contribution des auteurs.....	237
7.2 Résumé.....	238
7.3 Page titre.....	240
7.4 Abstract.....	241
7.5 Introduction.....	243
7.6 Materiel and Methods.....	246
7.7 Results.....	250
7.8 Discussion.....	254

7.9 Acknowledgements .....	258
7.10 References .....	259
7.11 Tables.....	268
7.12 Figure legends.....	269
7.13 Figures.....	271
<b>Chapitre 8: Discussion générale .....</b>	<b>278</b>
<b>Chapitre 9: Conclusions et Perspectives .....</b>	<b>292</b>
<b>Bibliographie .....</b>	<b>295</b>

# Liste des tableaux

## Chapitre 1

**Tableau 1** Classification de la MPOC selon la nomenclature du regroupement GOLD.

12

**Tableau 2** Traitements recommandés en fonction de la sévérité de la MPOC.

17

**Tableau 3** Principales comorbidités associées à la MPOC.

18

## Chapitre 3

**Table 1** Subject characteristics

95

## Chapitre 4

**Table 1** Subject characteristics

132

**Table 2** Subject characteristics used for primary culture

134

## Chapitre 5

**Table 1** Subject characteristics

173



**Table 2** mRNA expression in controls vs patients with COPD

177

Chapitre 6

**Table 1** Subject characteristics

221

Chapitre 7

**Table 1** Subject characteristics

263

# Liste des figures

## Chapitre 1

**Figure 1.1** Taux de mortalité des principales causes de décès aux États-Unis entre 1965 et 1998.

5

**Figure 1.2** Nombre d'hospitalisation causée par une MPOC au Canada de 1950 à 2010 répartie par sexe.

6

**Figure 1.3** Nombre de décès causé par une MPOC au Canada de 1950 à 2010 répartis par sexe.

9

**Figure 1.4** Courbe de survie de quatre sous-groupes de MPOC selon leurs fonctions respiratoires et leurs surfaces transverses à la mi-cuisse.

20

**Figure 1.5** Mécanismes proposés pour expliquer la perte de masse musculaire dans la MPOC.

23

**Figure 1.6** Prolifération et renouvellement des cellules satellites.

36

**Figure 1.7** Structure macroscopique et microscopique d'un muscle squelettique.

39

**Figure 1.8** Multiples signaux d'activation des cellules satellites.

43

### Chapitre 3

<b>Figure 3.1</b> Satellite cells quantification.	99
<b>Figure 3.2</b> Central nucleus quantification.	99
<b>Figure 3.3</b> Telomere length.	100
<b>Figure 3.4</b> Minimal, mean and maximum telomere length correlation with MTCSA.	101

### Chapitre 4

<b>Figure 4.1</b> Satellite cells quantification.	137
<b>Figure 4.2</b> Central nucleus quantification.	137
<b>Figure 4.3</b> Western blot against Pax7, MyoD, Myf5, Myogenin, MRF4 and Numb on total protein extract of the muscle biopsies obtained from the <i>vastus lateralis</i> .	138
<b>Figure 4.4</b> Proliferative potential in satellite cells isolated and cultured from controls and patients with COPD.	139
<b>Figure 4.5</b> Protein accumulation during myogenesis in satellite cells isolated and cultured from controls and patients with COPD.	140

**Figure 4.6** Skeletal myosin fast twitch protein accumulation during myogenesis in satellite cells isolated and cultured from controls and patients with COPD.

141

**Figure E1:** Primary myoblasts obtained from a needle biopsy of the *vastus lateralis* from a COPD patient after seven days in culture; X 10 magnifications.

142

**Figure E2:** Primary myotubes obtained from a needle biopsy of the *vastus lateralis* from a COPD patient after seven days in differentiation; X 10 magnifications.

143

## Chapitre 5

**Figure 5.1** Satellite cells quantification.

182

**Figure 5.2** Central nucleus quantification.

182

**Figure 5.3** Western blot against Myostatin, SMAD2, SMAD3, SMAD4, p21, MyoD, Myf5, Numb, Myogenin and MRF4 on total protein extract of the muscle biopsies obtained from the *vastus lateralis*.

183

**Figure 5.4** Proliferative potential in satellite cells isolated and cultured from controls and patients with COPD with or without recombinant myostatin.

184

**Figure 5.5** MRF protein accumulations during myogenesis in satellite cells isolated and cultured from controls and patients with COPD with or without recombinant myostatin.

185

**Figure 5.6** Skeletal myosin fast twitch protein accumulation during myogenesis in satellite cells isolated and cultured from controls and patients with COPD with or without recombinant myostatin.

186

**Figure 5.7** SMAD-related protein accumulations during myogenesis in satellite cells isolated and cultured from controls and patients with COPD with or without recombinant myostatin.

187

## Chapitre 6

**Figure 6.1** Satellite cells quantification.

224

**Figure 6.2** Central nucleus quantification.

225

**Figure 6.3** Quadriceps and diaphragm mRNA expression of myogenesis related genes.

226

**Figure 6.4** Quadriceps and diaphragm mRNA expression of myostatin related genes.

227

**Figure 6.5** Quadriceps and diaphragm mRNA expression of Atrogenes and inflammatory cytokines.

228

**Figure 6.6** Proliferative potential in satellite cells isolated and cultured from controls and patients with COPD with or without clenbuterol.

229

**Figure 6.7** MRF protein accumulation during myogenesis in satellite cells isolated and cultured from controls and patients with COPD with or without clenbuterol.

230

## Chapitre 7

**Figure 7.1** Plasma levels of A) SAA1, B) IL-6, C) IL-8 AND D) TNF in controls, clinically stable patient with COPD and exacerbated patient with COPD.

266

**Figure 7.2** Quadriceps mRNA expression of A) SAA1, B) p21, C) IL-6 D) Stat3 E) Jak2 and F) Nedd4 in control, clinically stable patient with COPD and exacerbated patient with COPD.

267

**Figure 7.3** C2C12 mRNA expression of A) Atrogin, B) MuRF, C) IL-6 and D) p21 in response of recombinant SAA1 and lipopolysaccharide after a stimulation of 24 hours on differentiated myotubes.

268

**Figure 7.4** C2C12 mRNA expression of A) SAA1 and B) p21 were quantified to determine the efficiency of the transfection.

269

**Figure 7.5** C2C12 mRNA expression of E3 ligases A) Atrogin, B) MuRF C) IL-1 D) TNF E) IL-6 F) Nedd4 G) Stat3 and H) SOCS3 were quantified to determine their accumulation.

270

**Figure 7.6** C2C12 mRNA expression A) Atrogin, B) MuRF, C) TNF, D) IL-6, E) p21, F) Nedd4, G) Stat3 and H) SOCS3 were quantified after a 4 and 24 hours stimulation with plasma of patient with stable and exacerbated patients with COPD and controls.

271

## Liste des abréviations

<b>AAT</b>	Alpha-1 Antitrypsine
<b>ADN</b>	Adénosine Désoxyribonucléique
<b>ANCOVA</b>	Analyse de Variance avec Covariables
<b>ANOVA</b>	Analyse de Variance
<b>ATS</b>	American Thoracic Society
<b>ARN</b>	Acide Ribonucléique
<b>bHLH</b>	basic Helix Loop Helix
<b>BMI</b>	Body Mass Index
<b>c-met</b>	Mesenchymal-Epithelial Transition factor
<b>COPD</b>	Chronic Obstructive Pulmonary Disease
<b>CRP</b>	C-reactive Protein
<b>CSA</b>	Cross Sectionnal Area
<b>CVD</b>	Cardiovascular Disease
<b>CVF</b>	Capacité Vitale Forcée
<b>DAPI</b>	4',6'-diamidino-2-phénylindole
<b>DHEA</b>	Déshydroépiandrostérone
<b>DHEAS</b>	Déshydroépiandrostérone Sulfate
<b>DLco</b>	Capacité de Diffusion du Monoxyde de Carbone
<b>DMEM</b>	Dulbelcco's Modified Eagle Medium
<b>DMSO</b>	Diméthylsulfoxyde
<b>EGF</b>	Epidermal Growth Factor
<b>FEV1</b>	Force Expiratory Volume in Second
<b>FGF</b>	Fibroblast Growth Factor
<b>FoxO</b>	Forkhead box of the class O
<b>FSH</b>	Follicle Stimulating Hormone
<b>FVC</b>	Force Vital capacity
<b>GH</b>	Growth Hormone
<b>GRE</b>	Glucocorticoid Response Element
<b>GSK-3<math>\beta</math></b>	Glycogen Synthase Kinase-3 $\beta$
<b>GOLD</b>	Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease
<b>HGF</b>	Hepatocyte Growth Factor
<b>IGF</b>	Insulin Growth Factor
<b>IL</b>	Interleukine
<b>LH</b>	Luteinizing Hormone
<b>MAP</b>	Mitogen Activated Protein

<b>MEF2</b>	Myocyte Enhancer Factor-2
<b>MHC</b>	Myosin Heavy Chain
<b>MTCSA</b>	Midhigh cross-sectional area
<b>MMP</b>	Métalloprotéases
<b>MPOC</b>	Maladie Pulmonaire Obstructive Chronique
<b>MRFs</b>	Myogenic Regulatory Factors
<b>mTOR</b>	mammalian Target of Rapamycin
<b>Myf5</b>	Myogenic Factor 5
<b>MyoD</b>	Myogenic differentiation 1
<b>NCAM</b>	Neural Cell Adhesion Molecule
<b>NFAT</b>	Nuclear factor of activated T-cells
<b>Nf-κB</b>	Nuclear Factor-κB
<b>NO</b>	Nitric Oxyde
<b>NRF2</b>	Nuclear Factor Erythroid-related Factor 2
<b>p21</b>	Cyclin-Dependent Kinase inhibitor 1
<b>Pax</b>	Paired Box transcription factors
<b>PBS</b>	Phosphate Buffer Saline
<b>PDGF</b>	Platelet Derived Growth Factor
<b>PI3K</b>	Phosphatidylinositol-3 Kinases
<b>RM</b>	Répétition Maximale
<b>ROS</b>	Reactive oxygen species
<b>SAA1</b>	Serum Amyloid A-1
<b>SD</b>	Standard Deviation
<b>SEM</b>	Standard Deviation of Mean
<b>SNPs</b>	Single Nucleotide Polymorphisms
<b>TGF</b>	Transforming Growth Factors
<b>TNF</b>	Tumor Necrosis Factor
<b>TNF-R</b>	Tumor Necrosis Factor Receptor
<b>TRF</b>	Telomeric Restriction Fragment
<b>TUNEL</b>	Terminal deoxynucleodityl Transferase-mediated dUTP-biotin Nick End Labelling
<b>UPP</b>	Ubiquitin Proteasome Pathway
<b>VEMS</b>	Volume Expiratoire Forcé en une Seconde



# Remerciements

De nombreuses personnes ont joué un rôle important dans la réalisation et l'accomplissement de cette dernière étape de mes études supérieures.

Je tiens tout d'abord à remercier le Dr. Richard Debigaré, mon directeur de recherche, sans qui je n'aurais eu l'opportunité de conduire avec passion ce projet de doctorat pendant 6 ans. Richard est un directeur passionné par la recherche et pour qui l'enseignement est très important, rendant cette expérience enrichissante.

Merci également à mon co-directeur, Dr. François Maltais pour avoir contribué de manière significative à cette thèse par son savoir et son désir d'améliorer le sort des malades pulmonaires.

Je tiens également à remercier Marc-André Caron, Annie Dubé, Bruno Lemire et Marie-Ève Paré d'avoir réussi à endurer mes niaiseries quotidiennes dans le labo. Merci de m'avoir appris les techniques, mais surtout de m'avoir offert un bon divertissement, rendant le tout des plus agréables.

Un incommensurable MERCI à mes parents et mon frère pour avoir toujours crû en moi, pour avoir toujours appuyé mes choix et pour avoir toujours supporté la direction que j'ai choisie. Merci!

Sans oublier amis, amies responsables du support moral nécessaire lors d'études graduées. Un merci spécial à Marc-André, Méli et votre progéniture pour les belles soirées en votre compagnie. Merci à Claude, Laetitia, Annie, et Sophie pour les semaines des 4 samedis. Merci aux amis du frisbee, particulièrement à Joëlle, pour m'avoir fait évoluer en tant que personne, cette réalisation est en partie grâce à vous et je n'en retiens que de bons moments.

## Avant-propos

Cinq articles scientifiques sont inclus dans cette thèse de doctorat. Le premier chapitre se veut une revue de littérature sur la maladie pulmonaire obstructive chronique. Ensuite, j'aborderai le thème de la dysfonction musculaire associée à cette maladie et finalement, une description des cellules satellites et de leurs possibles implications dans ce phénomène. Les chapitres 3, 4, 5, 6 et 7 contiennent les cinq articles originaux contenant l'ensemble des résultats présentés dans cette thèse. Le chapitre 3 a été publié en 2012 dans le *PLOS ONE* sous le titre : « *Satellite cells senescence in limb muscle of severe patients with COPD* ». Pour sa part, le chapitre 4: « *Regenerative defect in vastus lateralis muscle of patients with chronic obstructive pulmonary disease* » a été publié dans *Respiratory Research* en 2014. Le chapitre 5: « *Effect of an acute bout of resistance training on satellite cells and myostatin activities in patient with COPD* » sera soumis dans le *Journal of Applied Physiology* en 2016. Le chapitre 6 « *Comparative assessments of the regenerative activity in peripheral and respiratory skeletal muscle of patient with COPD* » est actuellement en préparation pour le soumettre au *Thorax* en 2016. Finalement, le chapitre 7: « *Relationship between the induction of Serum Amyloid A1 (SAA1) and p21 in COPD and muscle protein breakdown: a link with the inflammatory response?* » est également en préparation pour soumission à *L'American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*.

La participation détaillée des coauteurs des articles scientifiques sera présentée avant chacun des chapitres dans la section « mise en contexte et contribution des auteurs ».

# Liste des publications

## Thèse :

- Étude 1: **Satellite cells senescence in limb muscle of severe patients with COPD.** Marie-Eve Thériault, Marie-Ève Paré, François Maltais, Richard Debigaré. *PLoS ONE*. 2012.
- Étude 2: **Regenerative defect in vastus lateralis muscle of patients with chronic obstructive pulmonary disease.** Marie-Eve Thériault, Marie-Ève Paré, Bruno B. Lemire, Marc-André Caron, François Maltais, Richard Debigaré. *Respiratory Research*. 2014.
- Étude 3: **Effect of an acute bout of resistance training on satellite cells and myostatin activities in patients with COPD.** Marie-Eve Thériault, Bruno B. Lemire, Fernanda Ribeiro, Annie Dubé, Marie-Ève Paré, François Maltais, Richard Debigaré. Soumis à *The Journal of applied physiology*. 2016.
- Étude 4: **Comparative assessments of the regenerative activity in peripheral and respiratory skeletal muscle in patients with COPD.** Marie-Eve Thériault, Marie-Ève Paré, Annie Dubé, François Maltais, Richard Debigaré. Article en préparation pour soumettre à *Thorax*. 2016.
- Étude 5: **Relationship between the induction of Serum Amyloid A1 (SAA1) and p21 in COPD and muscle protein breakdown: a link with the inflammatory response?** Marie-Eve Thériault, Bruno B. Lemire, Annie Dubé, Fernanda Ribeiro, Marie-Ève Paré, François Maltais, Richard Debigaré. Article en préparation pour soumettre à *The American Journal of Respiratory Cells and Molecular Biology*. 2016.

## Autres contributions (non-incluses dans la thèse) :

- Revue 1: **Chapter 9 : Skeletal muscle dysfunction.** Marc-André Caron, Marie-Eve Thériault, Richard Debigaré, François Maltais. *Chronic Obstructive Pulmonary Disease: Co-morbidities and Systemic consequences*. Springer Science. 2012.

- Revue 2: **Should all patients with COPD be exercise-trained?** Fernanda Ribeiro, Marie-Eve Thériault, Richard Debigaré, François Maltais. *The Journal of applied physiology*. 2013.
- Étude 3: **Hypoxia alters contractile protein homeostasis in L6 myotubes.** Marc-André Caron, Marie-Eve Thériault, Marie-Ève Paré, François Maltais, Richard Debigaré. *FEBS letter*. 2009
- Étude 4: **MAPK signaling in the quadriceps of patients with chronic obstructive pulmonary disease.** Bruno Lemire, Richard Debigaré, Annie Dubé, Marie-Eve Thériault, Claude H. Côté, François Maltais. *The Journal of applied physiology*. 2012
- Étude 5: **Alterations in skeletal muscle cell homeostasis in a mouse model of cigarette smoke exposure.** Marc-André Caron, Mathieu M. Morissette, Marie-Eve Thériault, Jake K. Nikota, Martin Stämpfli, Richard Debigaré. *PLoS ONE*. 2013.
- Étude 6: **The Activation of Signalling Pathway Involved In Muscle Mass Regulation After an Acute Bout of Resistance Training Exercise in Patient with COPD.** Bruno Lemire, Annie Dubé, Marie-Eve Thériault, Richard Debigaré, François Maltais. Soumis à *The Journal of applied physiology*. 2013
- Étude 7: **SAA1 Expression in the Quadriceps of Patient with COPD.** Bruno Lemire, Annie Dubé, Marie-Eve Thériault, Yohan Bossé, Richard Debigaré, François Maltais. Soumis à *The American Journal of applied physiology*. 2013.

# **CHAPITRE I**

## **INTRODUCTION**

# Chapitre 1: Introduction générale

## Section 1.1 Maladie Pulmonaire Obstructive Chronique

### 1.1.1 Généralités

La Maladie Pulmonaire Obstructive Chronique (MPOC) est une atteinte pulmonaire caractérisée par une obstruction bronchique progressive et partiellement réversible limitant le débit expiratoire. Cette diminution est habituellement associée à une réponse inflammatoire anormale des poumons consécutive à une exposition de particule ou de gaz nocif. La MPOC regroupe deux maladies distinctes soit : l'emphysème et la bronchite chronique.<sup>4</sup>

La symptomatologie de la maladie est hétérogène et la combinaison des symptômes affecte grandement la qualité de vie des patients atteints. Les manifestations physiques de la maladie comprennent la fatigue, l'essoufflement et l'insomnie. Tous ces symptômes ont un impact psychologique considérable sur les personnes atteintes, augmentant leur niveau d'anxiété et leur irritabilité. Le symptôme le plus commun est la dyspnée, décrite comme une difficulté à respirer. Les sujets ayant une MPOC éprouvent régulièrement de la dyspnée lors de leurs activités quotidiennes, les contraignant à réduire graduellement leurs niveaux d'activité physique, adoptant ainsi mode de vie de plus en plus sédentaire. Cette sédentarité se traduit par une perte de la capacité fonctionnelle qui contribue à son tour à aggraver les symptômes de la maladie entraînant les personnes atteintes dans une spirale de déconditionnement physique.

L'obstruction des voies respiratoires dans la MPOC s'explique d'une part par une maladie des bronches (la bronchite chronique) et d'autre part par une destruction du parenchyme pulmonaire (l'emphysème) qui se développe

habituellement à la suite de plusieurs années d'exposition tabagique. Chez les patients ayant une MPOC, la contribution de la bronchite chronique ou de l'emphysème diffère selon chaque individu. <sup>5</sup>

La bronchite chronique se définit comme une hypersécrétion constante de mucus dans les bronches. Elle se caractérise par une toux et des expectorations survenant au moins une fois sur une période de plus de trois mois et pendant deux années consécutives sans autre diagnostic possible. <sup>4</sup> Une inflammation chronique occasionne des changements structuraux et un rétrécissement bronchique avec une production accrue de sécrétions. La destruction du parenchyme pulmonaire engendrée par l'inflammation chronique mène à la destruction des alvéoles entraînant une diminution du recul élastique pulmonaire et occasionnant l'affaissement des voies respiratoires lors de l'expiration. <sup>4</sup>

L'emphysème quant à lui se définit par une dilatation des espaces aériens distaux à la bronchiole terminale suite à la destruction des parois alvéolaires et à la perte du tissu de soutien. L'emphysème se subdivise en deux catégories : le premier type est l'emphysème centrilobulaire qui se caractérise par une destruction des voies aériennes distales, principalement au sommet des poumons. Le deuxième type est l'emphysème panlobulaire qui affecte les bronchioles terminales, les canaux et les sacs alvéolaires avec une prédominance aux bases du poumon. De manière générale, ce type d'emphysème se retrouve chez les gens ayant un déficit en alpha-1 antitrypsine (AAT), responsable de la protection des tissus pulmonaires contre des enzymes produites par des cellules inflammatoires, particulièrement l'élastase. <sup>4</sup>

Outre l'atteinte pulmonaire qui définit cette maladie, il est clairement démontré que les fonctions biologiques des tissus périphériques se détériorent au fur et à mesure que la MPOC progresse en sévérité. La détérioration du système musculaire intéresse particulièrement la

communauté scientifique compte tenu de son impact significatif sur la qualité de vie, la capacité fonctionnelle et la survie des patients atteints. <sup>6</sup>

### 1.1.2 Épidémiologie

La MPOC se classe au 4<sup>e</sup> rang des causes de décès chez les Canadiens et affecte près de 1 500 000 personnes au pays. Cependant, il s'agit d'une maladie largement sous-diagnostiquée<sup>7</sup> puisqu'on estime que 1 600 000 Canadiens de plus seraient possiblement symptomatiques. <sup>8</sup> On prévoit également que la MPOC grimpe au 3<sup>e</sup> rang mondial des causes de décès d'ici 2020<sup>9;10</sup> et ce, malgré la diminution croissante du nombre de fumeurs depuis les dernières années dans les pays industrialisés. Ce phénomène s'explique, entre autres, par une augmentation du nombre de fumeurs dans les pays en voie de développement. <sup>11</sup> La prévalence de la MPOC, 3.9% chez les hommes et 4.8% chez les femmes augmente avec l'âge. Dernièrement, une augmentation de la prévalence de la maladie chez les adultes dans la tranche de 45-49 ans a été rapportée. Une importante augmentation de la prévalence chez les femmes est également préoccupante. <sup>12</sup>

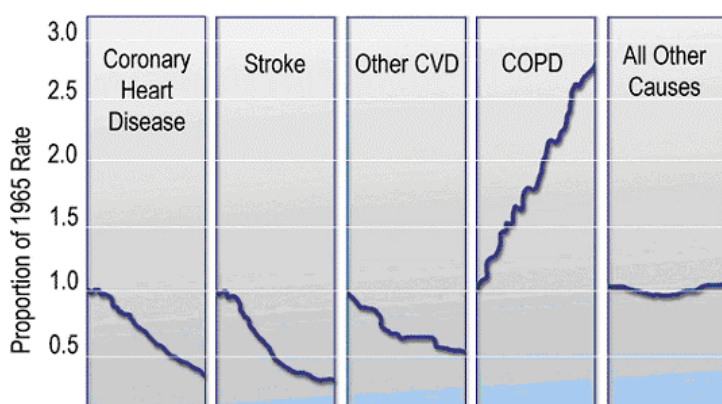


Figure 1.1 Différence en pourcentage du taux de mortalité de 1965 en comparaison avec le taux de mortalité de 1998 des principales causes de décès aux États-Unis. Abbreviations: CVD, Cardiovascular disease; COPD, Chronic Obstructive Pulmonary Disease

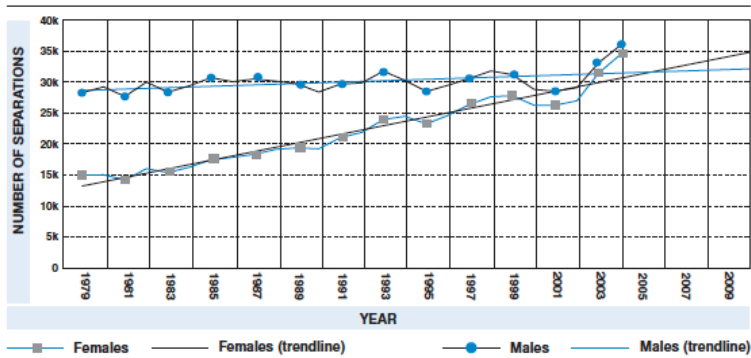
La figure 1.1<sup>6</sup> tiré d'un rapport de Santé Canada publié en 2002 montre l'amplitude de la progression du taux de mortalité relié à une MPOC de près de 163 % du nombre de décès en 1998 par rapport au taux de



l'année 1965 aux Etats-Unis, et ce, contrairement à toutes les autres maladies dont le taux de mortalité ne cesse de diminuer durant cette même période. Par exemple, les décès causés par les maladies cardiaques et les infarctus ont diminué significativement de près de 60 % en 1998 par rapport au taux de 1965.

Évidemment, l'impact financier de la MPOC est non négligeable. Au Canada, les coûts directs ont été estimés à 1,67 milliards \$ CND et à plus du double pour les coûts indirects selon le rapport de Santé Canada.<sup>13</sup>

Figure 6-6 Actual and projected COPD hospitalizations by sex, Canada\*, 1979-2010\*\*



ICD10 codes: J40-J44. Note that the coding schemes for this condition changed in 2000 and this may influence trends.  
 \* Data for territories unavailable prior to 1993 and data for Nunavut not available for 2002.  
 \*\* Hospitalizations for 2005 to 2010 are projected.  
 Source: Centre for Chronic Disease Prevention and Control, Public Health Agency of Canada, 2006 using data from Hospital Morbidity File (acute and chronic), Canadian Institute for Health Information.

Figure 1.2 Nombres d'hospitalisations actuelles et projetées dues à une MPOC au Canada de 1950 à 2010 réparties par sexe.<sup>2</sup>

L'augmentation de la prévalence de la maladie s'accompagne d'une augmentation des coûts liés au nombre d'hospitalisations et des décès. De plus, comme le démontre la figure 1.2, les prévisions pour les prochaines années ne sont guère optimistes.

### 1.1.3 Étiologie

La séquence d'événements conduisant au développement d'une MPOC est encore mal connue. Il n'en reste pas moins que la cause primaire du développement d'une MPOC est reliée au tabagisme. Le lent développement de la maladie explique également l'augmentation actuelle de la prévalence qui coïncide avec les années de fortes consommations tabagiques. Environ 25 % des fumeurs développent une MPOC au cours de

leur vie et étrangement, 10 à 20 % des gens qui n'auront jamais fumé développeront une maladie ayant des symptômes similaires à une MPOC conduisant éventuellement à la mort. <sup>14</sup> De plus, l'hétérogénéité de la maladie chez des sujets ayant eu une exposition similaire à la cigarette suggère que d'autres causes, comme une prédisposition génétique, sont impliquées dans son développement. <sup>15</sup>

D'ailleurs, les facteurs conduisant à la mise en place d'une MPOC sont divisés en deux catégories. La première catégorie concerne les facteurs intrinsèques, c'est-à-dire les prédispositions propres à chaque individu. La deuxième catégorie, les facteurs extrinsèques, comporte tous les facteurs environnementaux auxquels un individu fera face au cours de sa vie susceptibles de contribuer à l'initiation de la maladie.

#### **1.1.3.1 Facteurs intrinsèques**

Les facteurs génétiques, tel le déficit en alpha-1 antitrypsine (AAT), constituent les principaux facteurs intrinsèques susceptibles de contribuer au développement de la MPOC. Environ 1 à 2 % des personnes atteintes d'une MPOC seraient affectées par le déficit en AAT. Un test génétique étant nécessaire pour diagnostiquer cette maladie, on peut supposer une sous-estimation du taux réel de patients atteints du déficit en AAT. <sup>16</sup> Environ 75 à 80 % des personnes ayant ce défaut génétique développeront un emphysème panlobulaire. Il s'agit d'une atteinte autosomale récessive touchant le gène SERPINA1 qui code pour la protéine alpha-1 antitrypsine, une antiprotéase. La mutation résulte en une expression altérée du gène conduisant à une réduction de la traduction et de la synthèse protéique diminuant le niveau sérique de l'AAT. Les personnes sévèrement affectées auront des niveaux équivalents à 10 à 20 % des concentrations sériques normalement retrouvées chez des sujets sains. <sup>17</sup> Chez les sujets ayant une

carence en AAT, le ratio de protéases/antiprotéases n'est pas optimal, conduisant à la dégradation lente et continue de la matrice pulmonaire.<sup>18</sup>

D'autres gènes ont été ciblés pour tenter d'expliquer en partie le développement d'une MPOC, tels que ceux de la vitamine D<sup>19</sup>, le groupe sanguin ABO<sup>20</sup>, le « Tumor Necrosis Factor » (TNF), diverses « glutathione S-transferases »<sup>21</sup> et la « Heme oxygenase 1 ». <sup>22</sup> Cependant, les évidences démontrant un lien de causalité entre ces gènes et le développement de la MPOC demeurent faibles et non concluantes.

Si les prédispositions génétiques ne peuvent expliquer à elles seules les événements conduisant au développement de la MPOC, plusieurs études ont suggéré que des « single nucleotide polymorphisms » (SNPs) pourraient constituer une autre partie de l'énigme. Des études ont associé des polymorphismes sur le gène du TNF<sup>23</sup> et sur le gène de type IV du collagène  $\alpha 3$ <sup>24</sup> avec une susceptibilité accrue de développer la MPOC. Cependant, les résultats de ces études ne sont pas tous concordants et davantage d'études sont nécessaires pour confirmer leur rôle dans le développement de la MPOC.

Un autre facteur généralement reconnu comme agent contribuant à la réponse inflammatoire exagérée dans la MPOC, est la capacité à contrer les effets du stress oxydatif. L'équilibre oxydant/antioxydant doit être maintenu pour qu'un tissu puisse assurer sa survie et sa fonction. La fumée de cigarette est une source riche en oxydants et des évidences s'accumulent concernant l'augmentation du stress oxydatif chez les fumeurs.<sup>25</sup> Il a été établi que les poumons de patients ayant une MPOC ont une réduction marquée du niveau des facteurs antioxydants dont l'expression est dépendante du « Nuclear factor erythroid-related factor 2 » (NRF2).<sup>26</sup> Ainsi, les malades pulmonaires montrent une diminution du niveau des antioxydants sous le contrôle de NRF2 réduisant leurs capacités à contrer le stress oxydatif.

Finalement, la littérature a démontré que le sexe pouvait jouer un rôle dans le développement de la MPOC.

Premièrement, les femmes seraient davantage

susceptibles à avoir une hyperréactivité bronchique, un

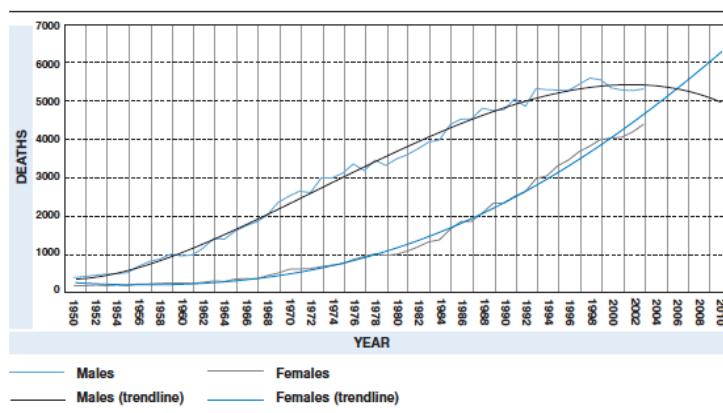
phénomène pouvant conduire au développement de la MPOC.

Deuxièmement, malgré certains résultats discordants, il apparaît que les femmes, par des facteurs physiologies et génétiques qui leurs sont propres, sont davantage prédisposées à développer une MPOC que les hommes.

La figure 1.3 illustre l'augmentation constante projetée du nombre de décès chez les femmes dues à cette maladie. L'augmentation des décès reliés à une MPOC chez les femmes correspond à la période de forte consommation tabagique chez celles-ci dans les dernières années et illustre le lent développement de cette maladie. De plus, pour un même stade de l'évolution de la maladie, la sévérité des symptômes (dyspnée, toux et expectoration) serait plus prononcée chez la femme que chez l'homme.

Les facteurs génétiques, tels qu'un déficit en AAT, seraient responsables de la susceptibilité à développer une MPOC sans assurément causer la maladie. Cependant, une combinaison de facteurs intrinsèques et extrinsèques pourrait expliquer l'hétérogénéité de la maladie que l'on retrouve entre les individus.

Figure 6-12 Actual and projected number of deaths for COPD by sex, Canada, 1950-2010\*



\* deaths from 2005 to 2010 are projected.  
ICD10 codes: J40-J44. Note that the coding schemes for this condition changed in 1968, 1978 and 2000 and this may influence trends.  
Source: Centre for Chronic Disease Prevention and Control, Public Health Agency of Canada, 2006 using Statistics Canada, Vital Statistics Data.

Figure 1.3 Nombre de décès actuels et projetés dus à une MPOC au Canada de 1950 à 2010 réparti par sexe <sup>2</sup>.

### **1.1.3.2 Facteurs extrinsèques**

Les facteurs extrinsèques se rapportent à l'environnement dans lequel un sujet évoluera au cours de sa vie. De manière générale, les substances nocives inhalées, les poussières et les polluants causant une inflammation pulmonaire sont des facteurs environnementaux susceptibles d'être impliqués dans le développement de la MPOC.

La cigarette est sans contredit la cause primaire de l'initiation des symptômes et des changements morphologiques retrouvés au niveau pulmonaire. La fumée de cigarette est le principal agent causal du développement d'une MPOC car elle est responsable de 90 % des cas diagnostiqués. Ce qui n'est pas surprenant puisque la combustion d'une cigarette libère minimalement 4800 composés différents.<sup>33</sup> Près de la moitié des fumeurs auront une obstruction des voies respiratoires et 10 à 20 % des fumeurs développeront une MPOC cliniquement significative.<sup>34</sup> Une corrélation existe entre le risque de développer la maladie et l'âge de début du tabagisme, le nombre de paquets fumés par année et l'exposition actuelle au tabagisme ou à la fumée secondaire.<sup>10</sup>

Parmi les autres facteurs extrinsèques pouvant contribuer au développement de la MPOC, on retrouve la pollution. Plusieurs études ont relié l'apparition des troubles cardio-pulmonaires à des taux élevés de pollution atmosphérique<sup>35;36</sup> ou à une exposition soutenue à des polluants atmosphériques.<sup>37</sup> De fait, une augmentation de la prévalence du diagnostic ou de symptômes de la MPOC a été associée avec des zones polluées.<sup>38</sup> Il va sans dire que l'air ambiant est un facteur à prendre en considération afin de démystifier les causes possibles du développement d'une MPOC surtout si l'on considère que certains pays utilisent encore aujourd'hui le charbon comme produit de combustion.

Certains environnements de travail peuvent potentiellement amorcer la séquence d'événements conduisant à une MPOC. Selon l'American Thoracic

Society (ATS), l'exposition au milieu de travail explique 15 % des cas diagnostiqués avec une maladie respiratoire incluant la MPOC et l'asthme.<sup>39</sup> Parmi les environnements contribuant au développement de la maladie, on retrouve les porcheries, les scieries et les mines.<sup>40</sup> Ces lieux ont tous en commun des niveaux élevés de poussières en suspension et polluants pénétrant facilement les voies respiratoires.

En somme, plusieurs facteurs intrinsèques et extrinsèques peuvent conduire au développement d'une MPOC. La combinaison d'un ou de ces facteurs déterminera la susceptibilité d'un sujet à être atteint d'une MPOC. Puisqu'il s'agit d'une maladie hétérogène, il est encore impossible d'identifier les sujets susceptibles de souffrir de cette maladie et la séquence des événements menant à son développement.

#### **1.1.4 Physiopathologie**

L'inhalation chronique de substances nocives telle que la fumée de cigarette amène une réponse inflammatoire pulmonaire. Les conséquences pathologiques de la MPOC touchent les voies respiratoires centrales, les petites voies respiratoires, le parenchyme pulmonaire et la vascularisation pulmonaire. Ces changements physiopathologiques engendrent plusieurs anomalies physiologiques incluant l'hypersécrétion de mucus, la dysfonction des cellules ciliées, une limitation du débit expiratoire, l'hyperinflation pulmonaire, des échanges gazeux anormaux et éventuellement une atteinte systémique.<sup>4</sup> Ces nombreux changements sont responsables de la toux, de l'abondance des expectorations et de la dyspnée, les trois principaux symptômes pulmonaires des patients atteints d'une MPOC.

Les changements physiopathologiques causant les divers symptômes amèneront les personnes atteintes à consulter un spécialiste. La prise en charge d'un patient se base sur l'évaluation des fonctions respiratoires. Il a été suggéré par le Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease

(GOLD) de faire un diagnostic chez les gens présentant les symptômes communs à la MPOC et ayant une histoire d'exposition aux facteurs de risque précédemment cités. Le principal outil utilisé dans le diagnostic de la MPOC est la spirométrie. <sup>41</sup> Le volume expiratoire maximal en une seconde (VEMS) est une mesure du débit aérien maximal calculé durant une seconde obtenue lors d'une manœuvre d'expiration forcée. Généralement, un ratio du VEMS rapporté sur la capacité vitale forcée (CVF) inférieure à 0,7 conduit le clinicien vers un diagnostic de MPOC. La sévérité de la maladie est déterminée selon les valeurs obtenues suite au test de spirométrie en fonction de la classification suggérée par le regroupement GOLD (Tableau 1).

**Tableau 1 Les quatre stades de la MPOC <sup>10</sup>**

<b>Classification des stades de sévérité de la MPOC</b>	
Stade	Caractéristiques
<b>0 : Personne à risque</b>	Spirométrie normale Symptômes chroniques (toux, production d'expectoration)
<b>I : MPOC légère</b>	VEMS/CVF < 70% VEMS ≥ 80% de la prédite Avec ou sans symptômes
<b>II : MPOC modérée</b>	VEMS/CVF < 70% 50% ≤ VEMS < 80% de la prédite Avec ou sans symptômes
<b>III : MPOC sévère</b>	VEMS/CVF < 70% 30% ≤ VEMS < 50% de la prédite Avec ou sans symptômes
<b>IV : MPOC très sévère</b>	VEMS/CVF < 70% VEMS < 30% de la prédite ou VEMS < 50% de la prédite + avec insuffisance respiratoire chronique

Tableau adapté du rapport Global Strategy for the Diagnosis, Management and Prevention of COPD 2008 de l'organisme Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease.

Trois processus sont importants dans la pathogenèse de la MPOC : l'inflammation, le déséquilibre protéases/antiprotéases et le stress oxydatif. Ces processus peuvent agir en synergie dans la destruction des structures pulmonaires.<sup>42</sup> Le chevauchement potentiel entre ces processus et le nombre de facteurs de risques susceptibles d'initier ou moduler ceux-ci complique la compréhension des phénomènes liés au développement de la MPOC. De fait, ce constat explique sans doute l'hétérogénéité de la maladie dans la population.

#### **1.1.4.1 Inflammation**

L'inflammation pulmonaire conduit à une hypersécrétion de mucus de la part des cellules sécrétrices dispersées dans l'arbre bronchique, le rétrécissement et la fibrose des voies aériennes, une destruction du parenchyme pulmonaire et une altération du système vasculaire.<sup>4</sup> L'inflammation pulmonaire se caractérise par une augmentation du nombre et du niveau d'activité des cellules résidentes et circulantes comme les macrophages, les lymphocytes et les neutrophiles.<sup>6</sup> Ces cellules sont responsables de la libération de plusieurs médiateurs susceptibles d'endommager le tissu pulmonaire en plus de maintenir le niveau de la réponse inflammatoire élevé. Cette réaction inflammatoire chronique a le potentiel de produire des dommages pulmonaires permanents contribuant à la progression de la maladie et au déclin des fonctions respiratoires.<sup>43</sup>

La réponse inflammatoire engendre la production et l'accumulation de mucus dans le tissu pulmonaire. Au niveau cellulaire, ce mucus est majoritairement peuplé de macrophages, de lymphocytes T CD8+ et de neutrophiles.<sup>44</sup> Par ailleurs, la proportion de neutrophiles augmente avec la progression de la maladie.<sup>45</sup> La fumée de cigarette peut, à elle seule, engendrer une réponse inflammatoire en plus d'augmenter le nombre total de leucocytes, un effet qui est amplifié chez les patients ayant une MPOC.<sup>46</sup>



L'augmentation de ces cellules inflammatoires a été démontrée chez des sujets ayant une MPOC à partir de biopsies bronchiques comparativement à des sujets témoins non-fumeurs.<sup>47</sup>

D'autres cellules comme les cellules épithéliales et les fibroblastes jouent également un rôle important dans l'inflammation et contribuent à la sévérité de la maladie. L'interaction de tous ces types cellulaires conduit à l'augmentation des médiateurs inflammatoires tels que les médiateurs lipidiques, comme les leucotriènes B<sub>4</sub>; des cytokines et chimiokines telles que l'IL-6 et l'IL-8; et des protéases impliquées dans le remodelage tissulaire.<sup>48</sup> Le processus inflammatoire est également responsable de l'augmentation du nombre des cellules musculaires lisses et de la quantité de tissu conjonctif dans l'arbre bronchique en plus d'une dégénérescence du cartilage.<sup>1</sup> Plusieurs études ont démontré que la fumée de cigarette serait suffisante pour causer toutes ces modifications.<sup>49-51</sup>

Outre la réponse inflammatoire pulmonaire, les patients ayant une MPOC démontrent des signes d'inflammation systémique, et ce, particulièrement lorsque la maladie est sévère, notamment par l'augmentation des niveaux sanguins de cytokines, de chimiokines et des protéines C réactives (CRP).<sup>52</sup> Parmi les cytokines augmentées chez les patients ayant une MPOC en période d'exacerbation, il y a l'interleukine-6 (IL-6).<sup>53</sup> Cette cytokine augmente les niveaux circulants de la Serum Amyloid A1 (SAA1) en provenance du foie.<sup>54</sup> Elle pourrait également être reliée à la dysfonction du muscle périphérique en induisant l'expression de plusieurs cytokines qui peuvent agir directement sur les protéines musculaires.<sup>54;55</sup> L'élévation des niveaux sanguins du « Tumor Necrosis Factor » (TNF) et de son récepteur soluble (TNF-R) a également été démontrée chez des patients ayant une MPOC.<sup>56</sup> Cette cytokine peut également contribuer à l'atrophie musculaire.<sup>57;58</sup> Une autre conséquence de l'inflammation est la relâche d'espèces réactives oxygénées (ROS) provenant des cellules inflammatoires activées, qui accentue davantage les dommages aux tissus pulmonaires.<sup>4;59</sup>

L'origine de la réponse inflammatoire systémique reste à être établie en identifiant, entre autres, si les marqueurs détectés proviennent de l'inflammation pulmonaire ou s'ils sont reliés à une réponse inflammatoire tissulaire parallèle. Qu'importe l'origine de cette inflammation, elle a le potentiel d'accentuer les manifestations systémiques conséquentes à la MPOC en plus d'aggraver les différentes comorbidités. De plus, l'inflammation systémique peut prématurément diminuer les fonctions pulmonaires.<sup>60</sup>

#### **1.1.4.2 Déséquilibre protéases/antiprotéases**

L'absence d'AAT conduit au développement de l'emphysème.<sup>61</sup> Cette observation a conduit à l'hypothèse voulant que le développement de cette maladie est causé par un déséquilibre quantitatif entre les protéases (ex : neutrophiles élastases, métalloprotéases, cathepsines) et les antiprotéases (ex : AAT, cystatine C).<sup>62</sup> L'usage de certains modèles animaux où l'instillation d'une protéase induit des changements physiopathologiques comparables à l'emphysème supporte d'ailleurs cette hypothèse.<sup>63</sup> De fait, la persistance de la réponse inflammatoire augmente le nombre de cellules inflammatoires telles que les macrophages et les neutrophiles pulmonaires.<sup>64</sup> De même, cette réponse inflammatoire est capable d'engendrer un déséquilibre de l'équilibre entre les protéases et les antiprotéases.<sup>65</sup> Les neutrophiles contiennent de larges quantités de protéases telles que l'élastase, la cathepsine G, la protéinase-3, diverses métalloprotéases (MMP) en plus de produire des ROS.<sup>59</sup> Dans les expectorations de patients ayant une MPOC, il existe une corrélation entre le niveau de chimioattractant pour les neutrophiles (IL-8) avec une diminution des fonctions pulmonaires.<sup>66</sup> Par ailleurs, les macrophages pulmonaires des sujets ayant une MPOC contiennent une forte concentration de diverses MMP, reconnues pour leur capacité à dégrader les protéines de la matrice extracellulaire comme le collagène et l'élastine.<sup>67</sup> Dans la MPOC, les MMP les plus fréquentes dans

les poumons sont les MMP-1, MMP-2, MMP-9 et MMP-14.<sup>68;69</sup> Un déséquilibre entre la quantité de protéases et d'antiprotéases conduit vers la destruction du parenchyme pulmonaire et, ultimement l'emphysème.

#### **1.1.4.3 Stress oxydatifs**

Le stress oxydatif est causé par un déséquilibre entre la production de ROS et la capacité de l'organisme à s'en débarrasser. La production de ROS est le résultat d'une multitude de réactions enzymatiques effectuées en présence d'oxygène. Une quantité importante de ROS peut conduire à la mort cellulaire par l'enclenchement de l'apoptose.<sup>70</sup> Outre l'inhalation de fumée de cigarette, une réaction inflammatoire est aussi une importante source de ROS. Dans le poumon, les neutrophiles, les éosinophiles, les macrophages alvéolaires, les cellules épithéliales et endothéliales sont tous des types cellulaires aptes à produire des ROS.<sup>71</sup> Il est reconnu que les oxydants peuvent causer des dommages à l'ADN, la peroxydation des lipides et l'oxydation des protéines.<sup>72</sup> Ces dommages sont susceptibles d'altérer le bon fonctionnement des cellules résidentes du poumon contribuant ainsi au développement de la MPOC. La présence d'un stress oxydant accru a été démontrée dans la MPOC par la mesure de différents aldéhydes et de marqueurs de la peroxydation des lipides provenant d'air condensé recueilli de sujets malades.<sup>73</sup>

En résumé de cette section, la réponse inflammatoire joue sans contredit un rôle majeur dans les changements physiopathologiques observés dans le tissu pulmonaire. L'inflammation conduit à l'augmentation du stress oxydatif dans les poumons et peut également engendrer un déséquilibre protéases/antiprotéases. L'intensité et la durée de cette réponse inflammatoire, associée ou non aux deux autres processus participant à la pathogenèse, contribuent sans doute à l'hétérogénéité de la MPOC.

### **1.1.5 Traitements**

La MPOC est une maladie progressive et irréversible. Actuellement, la seule intervention susceptible de ralentir la progression de la maladie est l'arrêt du tabagisme. Cependant, même si l'arrêt tabagique provoque la stabilisation, voire une amélioration de la fonction pulmonaire, la réponse inflammatoire amorcée précédemment persiste souvent pendant plusieurs années.

Outre par la transplantation pulmonaire, la MPOC ne peut être guérie. Cependant, des traitements pour rétablir les fonctions respiratoires (bronchodilatateurs), réduire l'inflammation (glucocorticoïdes), et contrôler les infections (antibiotiques) peuvent être prescrits afin de diminuer les effets néfastes de la MPOC sur la qualité de vie.<sup>78;79</sup> Le tableau 2<sup>10</sup> résume les divers traitements dont peut bénéficier un patient en fonction de la sévérité de la maladie.

**Tableau 2 Traitement utilisé en fonction de la sévérité de la maladie.**

Thérapies selon chaque stade de la MPOC		
Stade	Caractéristiques	Traitement recommandé
<b>Tous les stades</b>		Éviter les facteurs de risques Vaccination contre la grippe
<b>0 : Personne à risque</b>	Symptômes chroniques (toux, expectorations) Exposition aux facteurs de risques Spirométrie normale	
<b>I : MPOC légère</b>	VEMS/CVF < 70% VEMS ≥ 80% de la prédite Avec ou sans symptômes	Bronchodilatateur de courte action lorsque nécessaire
<b>II : MPOC modérée</b>	<b>IIA</b> VEMS/CVF < 70% 50% ≤ VEMS < 80% de la prédite Avec ou sans symptômes	Traitement régulier avec un ou plusieurs bronchodilatateurs Réadaptation pulmonaire Inhalation de glucocorticoïdes si présence de symptômes significatifs et amélioration des fonctions pulmonaires
	<b>IIB</b> VEMS/CVF < 70% 30% ≤ VEMS < 50% de la prédite Avec ou sans symptômes	Traitement régulier avec un ou plusieurs bronchodilatateurs Réadaptation pulmonaire Inhalation de glucocorticoïdes si présence de symptômes significatifs et amélioration des fonctions pulmonaires ou exacerbations répétées
<b>III : MPOC sévère</b>	VEMS/CVF < 70% VEMS < 30% de la prédite ou VEMS < 50% de la prédite avec insuffisance respiratoire ou insuffisance cardiaque droite	Traitement régulier avec un ou plusieurs bronchodilatateurs Glucocorticoïdes inhalés si présence de symptômes significatifs et amélioration des fonctions pulmonaires ou exacerbations répétées  Traitement des complications Réadaptation pulmonaire Oxygénothérapie si hypoxémie Considérer un traitement chirurgical

Tableau adapté du rapport Global Strategy for the Diagnosis, Management and Prevention of COPD 2008 de l'organisme Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease.

### 1.1.6 Effets systémiques associées à la MPOC

La réponse inflammatoire subséquente à l'inhalation de fumée de cigarette ou de particules et la présence de stress oxydatif sont des facteurs de risque connus pour d'autres maladies. Lorsqu'un patient a déjà été diagnostiqué avec une maladie prédominante comme la MPOC et qu'il reçoit un second diagnostic de maladie, on parle alors de comorbidité. Le tableau 3 dresse une liste des nombreuses comorbidités qui peuvent être associées à la MPOC. Les plus fréquentes sont les maladies reliées à l'arbre bronchique, les maladies cardiovasculaires, le diabète de type 2, l'ostéoporose et la dysfonction musculaire. La présence d'une comorbidité contribue au pronostic de morbidité et accentue le risque de mortalité du patient atteint.<sup>80</sup>

**Tableau 3 Principales comorbidités associées à la MPOC<sup>81</sup>**

---

#### **Principales comorbidités associées à la MPOC**

---

##### **Respiratoire**

Insuffisance respiratoire, asthme, allergie, pneumonie, embolie pulmonaire, maladie vasculaire pulmonaire, infections respiratoires, rhinite

##### **Cardiovasculaire**

Ischémie cardiaque, hypertension, insuffisance cardiaque, arrêt cardiaque, arythmie, angine, infarctus du myocarde, accident vasculaire cérébral, athérosclérose périphérique

##### **Cancer**

Cancer des poumons, tumeur maligne de la cage thoracique

##### **Endocrine**

Obésité, diabète, hyperlipidémies, réduction nutritionnelle

##### **Gastro-intestinale**

Ulcère, symptômes de reflux gastriques, incontinence fécale

##### **Maladie Rénale**

##### **Ostéo-artuculaire**

Fractures osseuses, fractures, désordres des articulations, arthrite, ostéoporose

##### **Oculaire**

Cataractes, glaucome

##### **Psychiatrique**

Dépression / anxiété

##### **Autres**

Maladie de la peau, migraine, faible qualité de vie

---

Tableau adapté de Viegi et al.<sup>82</sup>

Il s'avère qu'une diminution de la fonction pulmonaire, indépendamment du niveau de cholestérol, de l'hypertension et du tabagisme, est un risque de développement d'une maladie cardiovasculaire chez un individu donné.<sup>83</sup> Dans une étude de la Lung Health Study, il a été établi que les deux premières causes d'hospitalisation chez des personnes souffrant d'une MPOC sont reliées à des troubles cardiovasculaires.<sup>84</sup> Les mécanismes cellulaires sont unis par une voie commune, possiblement reliés à l'inflammation systémique, et ce, même si cette inflammation est présente à un degré modéré.<sup>85</sup>

Le risque de développer un diabète de type 2 est augmenté de 1,5 à 2 fois chez les personnes ayant une MPOC comparativement à une personne n'ayant pas de maladies pulmonaires.<sup>86</sup> Bien que plusieurs hypothèses aient été suggérées pour expliquer le risque accru de diabète dans la MPOC, aucune étude n'a clairement énoncé le mécanisme responsable. L'hyperglycémie, un facteur de risque de développement du diabète, pourrait être induite par les composés stéroïdiens couramment utilisés dans le traitement de la MPOC.<sup>87</sup>

Le risque de développer de l'ostéoporose est plus élevé chez les personnes ayant une MPOC et atteint des proportions de l'ordre de 36 à 70 %.<sup>88</sup> Il faut noter que cette proportion augmente en fonction de la sévérité de la maladie. Le risque de développer une ostéoporose chez un patient ayant une MPOC augmente en fonction de la sévérité de la maladie et avec l'utilisation d'un traitement aux corticostéroïdes.<sup>89</sup>

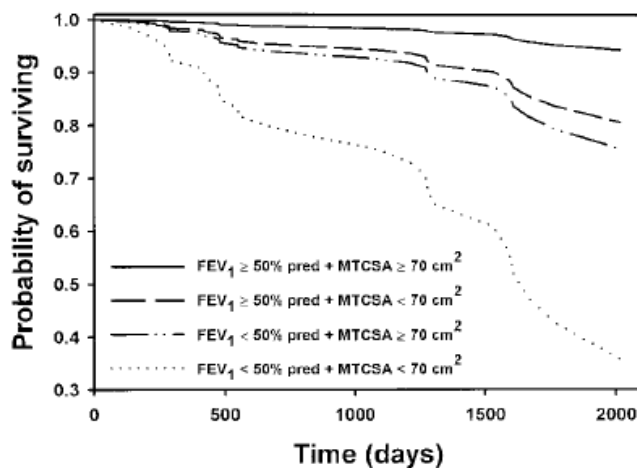
Les autres altérations systémiques observées dans la MPOC sont à l'origine d'un handicap significatif réduisant la qualité de vie des patients atteints de la MPOC.

### 1.1.7 Dysfonction musculaire

Compte tenu de ses impacts cliniques, la dysfonction musculaire est une des atteintes systémiques les plus importantes chez les patients ayant une MPOC. L'atteinte de la fonction musculaire affecte directement et indépendamment la qualité de vie <sup>6</sup>, la résistance à l'effort <sup>90;91</sup>, l'utilisation des soins de santé <sup>92</sup> et augmente le risque de mortalité <sup>93;94</sup> chez les patients ayant une MPOC.

Dans la MPOC, la dysfonction musculaire périphérique se caractérise principalement par une modification du métabolisme énergétique en faveur de la glycolyse anaérobie <sup>95</sup>, un changement dans la proportion du type des fibres musculaires <sup>96</sup> et une diminution du volume musculaire. <sup>97</sup> La dysfonction musculaire associée à la MPOC atteint davantage les muscles des membres inférieurs que les muscles respiratoires et les muscles des membres supérieurs. <sup>98</sup> L'atrophie musculaire est associée à une diminution de la force musculaire de l'ordre de 20 à 30 % chez les sujets ayant une MPOC par rapport à celle des sujets témoins. <sup>99</sup> Dépendamment de la sévérité de la maladie et la population à l'étude, les patients ayant une réduction de la masse musculaire représentent de 4 à 35 % des sujets. <sup>100;101</sup>

La faiblesse musculaire a des répercussions importantes sur la capacité fonctionnelle et la tolérance à l'effort indépendamment de la sévérité de la maladie. <sup>102</sup> Pour plus de 40 % des patients, la fatigue musculaire est le principal symptôme limitant l'exercice et



non pas la dyspnée. <sup>103</sup> Le stade de la maladie

Figure 1.4 Courbe de survie de quatre sous-groupes de MPOC selon leurs fonctions respiratoires et leurs surfaces transverses à la mi-cuisse.



combiné à une faible masse musculaire génère des conséquences importantes sur la morbidité et la mortalité comme démontré à la figure 1.4.<sup>93</sup> Cette figure montre une nette diminution de la probabilité de survie à long terme pour le groupe de sujets ayant un VEMS < 50 % de la valeur prédite et une surface de section du *vastus lateralis* inférieure à 70 cm<sup>2</sup> comparativement à des sujets ayant un degré d'obstruction semblable et une surface de section du *vastus lateralis* supérieure à 70 cm<sup>2</sup>. Par ailleurs, ces patients sont plus susceptibles à une hospitalisation à la suite d'une exacerbation.<sup>104</sup>

Plusieurs hypothèses ont été avancées afin d'expliquer la dysfonction musculaire périphérique observée chez les patients ayant une MPOC. Outre l'inactivité physique, d'autres facteurs comme le déficit énergétique, le stress oxydatif, l'inflammation systémique, le déficit hormonal, l'hypoxémie et l'altération de la régénération musculaire ont tous été évoqués dans la littérature.<sup>105</sup> Ces mécanismes seront brièvement abordés dans la section suivante et une attention particulière sera apportée à l'altération de la régénération du tissu musculaire, sujet principal de cette thèse de doctorat.

## Section 1.2 Atrophie musculaire périphérique dans la MPOC

Le ou les mécanismes responsables de l'initiation et du développement de l'atrophie musculaire dans la MPOC demeurent une source de questionnement pour la communauté scientifique. Il est important d'élucider les mécanismes sous-jacents à l'atrophie musculaire dans la MPOC afin de développer des stratégies visant à réduire leurs effets néfastes sur la capacité fonctionnelle et la qualité de vie des sujets atteints. La figure 1.5 démontre bien le nombre et la complexité des différents mécanismes pouvant être impliqués dans la dysfonction musculaire associée à la MPOC. Selon la théorie actuelle, les principaux mécanismes conduisant à une perte de masse musculaire en dehors du processus normal de vieillissement sont l'inactivité chronique, la malnutrition, le stress oxydatif, le déséquilibre lié à la balance anabolisme/catabolisme, l'hypoxémie et une régénération musculaire déficiente. L'altération de la régénération musculaire commence tout juste à être étudiée et mérite de recevoir notre attention puisqu'elle peut être influencée directement par les mécanismes initiant l'atrophie musculaire schématisés à la figure 1.5.<sup>105</sup>

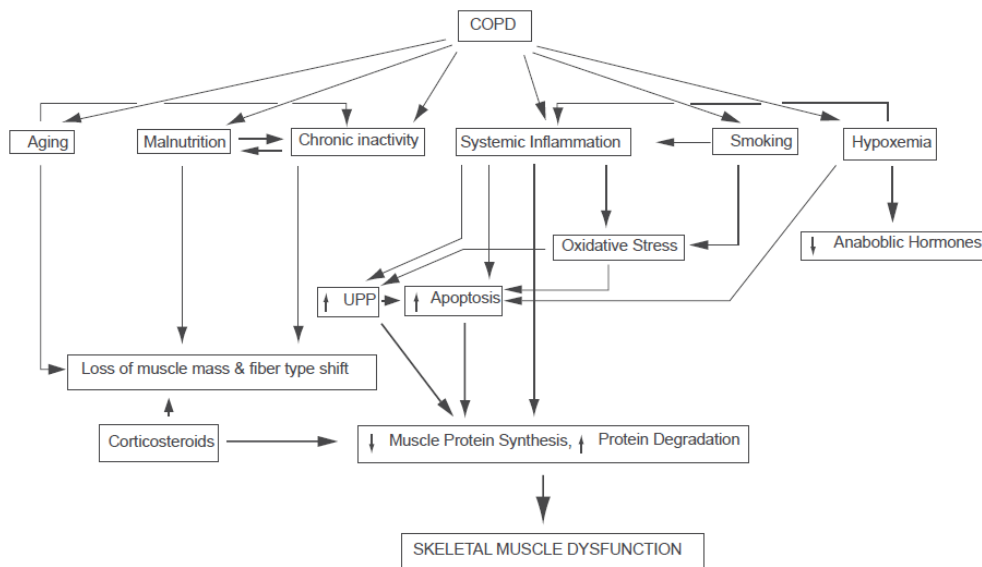


Figure 1.5 Mécanismes proposés menant à une perte de masse musculaire dans la MPOC <sup>106</sup> Abbréviations : COPD, Chronic Obstructive Pulmonary Disease; UPP, Ubiquitin Proteasome Pathway.

Les mécanismes proposés conduisant à une perte de masse musculaire dans la MPOC ont tous un impact sur l'équilibre entre la synthèse et la dégradation des protéines musculaires. Une augmentation de la synthèse protéique mène à l'hypertrophie alors qu'une augmentation de la dégradation protéique se traduit par l'atrophie musculaire. Souvent dans les maladies chroniques, cet équilibre penche davantage du côté de la dégradation protéique, favorisant la dysfonction musculaire. <sup>107</sup> Dans la MPOC, la fonction et la structure du muscle squelettique sont altérées et la balance nette protéique penche vers la dégradation. <sup>108</sup> Avant d'aborder les mécanismes potentiellement impliqués dans la dysfonction musculaire associée à la MPOC, il est important de survoler les voies de signalisation impliquées dans la synthèse et la dégradation protéiques dans le muscle.

## **1.2.1 Voies de signalisation impliquées dans la synthèse et la dégradation des protéines musculaires**

### ***1.2.1.1 Synthèse protéique***

Dans la cellule musculaire, de multiples voies de signalisation sont aptes à convertir une stimulation extracellulaire en une augmentation de la transcription des acides ribonucléiques messagers (ARNm). Parmi celles-ci, la voie de l'IGF/PI3K/Akt joue un rôle central autant dans les processus anaboliques que dans les processus cataboliques. Cette voie est impliquée dans la synthèse protéique et dans les processus hypertrophiques en réponse à des stimuli tels que l'exercice. <sup>109</sup> Au centre de cette voie, la protéine kinase Akt est responsable d'une multitude de processus favorisant la survie cellulaire <sup>110</sup>, la synthèse protéique, la différenciation cellulaire et la

synthèse de signaux proapoptotiques.<sup>111</sup> Dans cette cascade, l'IGF-1 se lie à son récepteur, une sérine/thréonine kinase qui phosphoryle et active entre autres Akt. L'activation de cette kinase promeut la synthèse des protéines par l'activation du « mammalian target of rapamycin » (mTOR), une protéine pivot dans la traduction protéique<sup>112</sup> et de la « protein 70 s6 kinase » (p70S6K), une kinase nécessaire pour le maintien de la masse musculaire.<sup>113</sup> De plus, la phosphorylation d'Akt bloque la « glycogen synthase kinase-inhibitor 3 $\beta$  » (GSK-3 $\beta$ ), un inhibiteur de la synthèse protéique.<sup>114</sup> L'altération d'un ou de plusieurs médiateurs dans cette signalisation peut avoir d'importantes répercussions au niveau de la masse musculaire.

#### **1.2.1.2 Dégradation protéique**

Environ 1 à 2 % des noyaux musculaires sont remplacés par apoptose hebdomadairement afin de suffire à la demande des fibres musculaires.<sup>115</sup> Quotidiennement, des protéines musculaires altérées sont dégradées afin d'être remplacées. La voie de signalisation de l'ubiquitine-protéasome est responsable de la majorité de cette dégradation protéique. Autrement, les systèmes des lysosomes, des caspases et des calpaïnes vont dégrader les protéines structurales trop volumineuses pour entrer dans le protéasome.

Le système de l'ubiquitine-protéasome est le système de prédilection pour dégrader les protéines.<sup>116</sup> La démonstration de l'augmentation de l'activité des deux ubiquitines-ligases E3 spécifiques aux tissus musculaires, Atrogin1 et MuRF1 dans divers modèles d'atrophie musculaire tels que l'urémie, le diabète, la dénervation et l'inflammation systémique<sup>117;118</sup> ont jeté les bases moléculaires pour expliquer les mécanismes reliés à l'atrophie musculaire. En fait, une augmentation de ces deux E3 ligases a été démontrée dans 13 modèles d'atrophie musculaire tant chez les humains que chez les rongeurs.<sup>119</sup> La famille de facteurs de transcription « Forkhead box protein O » (FoxO) sont les principaux régulateurs de l'expression des ces

deux E3 ligases.<sup>120</sup> La principale voie de signalisation qui contrôle la famille des FoxO est celle de la protéine kinase Akt.<sup>121</sup> Akt inhibe l'expression des E3 ligases par l'entremise de la phosphorylation de FoxO<sup>122</sup>, ce qui séquestre le facteur de transcription dans le cytoplasme. Une fois séquestré au cytoplasme, FoxO ne peut pas transcrire les ARNm des E3 ligases nécessaire à la dégradation protéique via la voie de l'Ubiquitine-protéasome (Ub-P'some). Fait intéressant, la kinase Akt contrôle les processus conduisant à la synthèse protéique en plus d'exercer un effet sur les processus conduisant à la dégradation protéique.<sup>123</sup>

Le système des lysosomes est une composante majeure des cellules mammifères. Les lysosomes sont des vésicules intracellulaires contenant une forte concentration de protéases, de glycosidases, de lipases, de nucléases et phosphatases. Les lysosomes se chargent de la dégradation d'une variété de macromolécules extracellulaires atteignant ce compartiment par des processus comme l'endocytose, la pinocytose et la phagocytose. Les cathepsines sont des protéases retrouvées dans les lysosomes et l'élévation de leur expression a été démontrée dans quelques modèles d'atrophie musculaire comme lors d'un séjour en altitude<sup>124</sup>, la sarcopénie<sup>125</sup> et la dystrophie.<sup>126</sup>

Les caspases sont bien reconnues pour leur rôle dans la régulation de l'apoptose.<sup>127</sup> Une étude publiée en 2004 a permis de démontrer l'implication de la caspase-3 dans la dégradation protéique musculaire.<sup>128</sup> Dans ce rôle, la caspase-3 agit en fractionnant l'actomyosine, le complexe protéique formant les myotubes.<sup>129</sup> Le protéasome est incapable de dégrader un arrangement d'actomyosine intact, de par sa structure trop volumineuse, ce qui rend l'intervention des protéases nécessaires.<sup>130</sup> L'étape initiale afin de permettre l'entrée de ces protéines dans le protéasome est en partie du ressort de la caspase-3 et un dérèglement de son activité pourrait conduire au processus d'atrophie musculaire.<sup>131</sup>

Les calpaïnes sont des cystéines protéases dépendantes du calcium et sont activées suite à des dommages cellulaires responsables de la libération d'ions de calcium.<sup>132</sup> Tout comme les caspases, ces protéases ont pour rôle le fractionnement des protéines du sarcomère pour les rendre accessibles au protéasome.<sup>133</sup> La voie des calpaïnes peut sans contredit jouer un rôle important dans la fragilisation du sarcomère menant à l'atrophie musculaire tel que démontré dans un modèle murin de dystrophie musculaire.<sup>134</sup>

Le muscle squelettique est un tissu malléable capable d'altérer son type et sa quantité de protéines en réponse à des perturbations de l'homéostasie cellulaire. Le stress oxydant, l'inflammation et la contraction musculaire représentent de puissants stimuli qui peuvent générer des perturbations significatives dans le milieu cellulaire et ainsi provoquer des modulations importantes et initier une adaptation à l'environnement extracellulaire.

#### ***1.2.1.3 Synthèse/dégradation des protéines dans le muscle des patients ayant une MPOC***

Les études visant à déterminer les voies de signalisation cellulaire impliquées dans l'étiologie de la dysfonction musculaire associée à la MPOC sont de plus en plus présentes dans la littérature.

Parmi celles-ci, Doucet et al. ont démontré une augmentation des niveaux d'expression en ARNm de MuRF1 et Atrogin1 ainsi que l'accumulation de la protéine FoxO dans le quadriceps des patients atteints de MPOC. Ces augmentations suggèrent une modulation de l'activité des voies atrophiantes chez les patients atteints d'une MPOC.<sup>135</sup> Contrairement à l'hypothèse de départ, ils ont aussi démontré une augmentation de la phosphorylation d'Akt, suggérant que la régulation transcriptionnelle de MuRF1 et Atrogin1, par l'intermédiaire FoxO se produit indépendamment

d'Akt. Une augmentation du niveau de phosphorylation de trois protéines associées à l'hypertrophie musculaire (p70<sup>S6K</sup>, GSK-3 $\beta$  et 4E-BP1) a aussi été observée chez les patients atteints de MPOC et ayant une faible masse musculaire par rapport aux patients ayant une masse musculaire préservée.<sup>135</sup> Les auteurs ont proposé que ces observations étaient le résultat d'une boucle de rétroaction non fonctionnelle afin de compenser le processus d'atrophie musculaire présent chez ces patients. Ces résultats ont été corroborés dans une autre étude démontrant également une augmentation d'Atrogin1 et de Nedd4, une autre E3 ligase impliquée dans le marquage des protéines à dégrader.<sup>136</sup> Par contre, cette étude n'a pas démontré des niveaux plus élevés de phosphorylation d'Akt, de p70<sup>S6K</sup> et de GSK-3 $\beta$  dans le quadriceps des patients ayant une MPOC. Plus récemment, que les MAPK pouvaient également être impliquées dans la dégradation des protéines musculaires du quadriceps des patients ayant une MPOC.<sup>137</sup>

Plusieurs voies de signalisation sont ainsi capables d'influencer la synthèse et la dégradation des protéines musculaires, l'apport de ces voies en plus de celle de l'IGF/PI3K/Akt font possiblement pencher la balance vers la dégradation des protéines dans les maladies chroniques comme la MPOC.

### **1.2.2 Inactivité chronique**

Un des premiers symptômes apparaissant dans la MPOC est l'intolérance à l'effort conduisant à la réduction de l'activité physique. Puisque l'activité physique est primordiale pour maintenir le volume musculaire<sup>138</sup>, il est plausible que l'inactivité physique soit impliquée dans l'initiation et la dysfonction musculaire associée à la MPOC.<sup>139</sup>

La dyspnée et la fatigue limitent les activités quotidiennes, telle la marche. De fait, les personnes ayant une MPOC ont une distance de marche diminuée de trois fois, lorsque comparées à des gens du même âge sans maladie pulmonaire.<sup>140</sup> Il est démontré que l'inactivité physique contribue à

réduire les qualités du tissu musculaire.<sup>141</sup> D'ailleurs, une augmentation du niveau d'activité physique diminue le nombre hospitalisation et la mortalité chez les patients ayant une MPOC.<sup>142</sup> Par ailleurs, le profil métabolique des muscles locomoteurs est inversé dans les muscles respiratoires chez les patients ayant une MPOC suggérant l'inactivité comme facteur responsable de cette modification.<sup>143</sup> Le diaphragme par exemple, démontre une capacité oxydative augmentée et une augmentation des fibres de type I, ce qui est à l'opposé du profil observé dans le quadriceps.<sup>144;145</sup> Ces adaptations laissent présager que les effets de l'inactivité physique affectent davantage les muscles impliqués dans la locomotion que les muscles respiratoires.

Par contre, une étude a démontré dans un modèle d'hamsters emphysémateux que malgré un niveau d'activité similaire entre les groupes, les animaux malades ont une réduction des capacités oxydatives du tissu musculaire<sup>146</sup>. Cette observation suggère que d'autres facteurs, outre l'inactivité physique, sont impliqués dans les adaptations musculaires conséquentes à la MPOC.

### **1.2.3 Déficit énergétique**

L'hypothèse du déficit énergétique pour tenter d'expliquer l'atrophie musculaire dans la MPOC repose sur la supposition que ces patients ont une dépense énergétique accrue comparativement à des sujets sains.<sup>147</sup> Cette dépense d'énergie supplémentaire proviendrait d'un travail respiratoire augmenté en raison de l'obstruction bronchique.<sup>148</sup> Les patients ayant une MPOC dépensent en moyenne 10 % plus d'énergie que des sujets d'âge, de taille et de poids similaire.<sup>149</sup> L'hyperinflation pulmonaire et l'augmentation de la résistance inspiratoire contribuent à l'augmentation du travail respiratoire résultant en une augmentation du métabolisme et de la consommation en oxygène.<sup>150;151</sup>



La présence de patients cachectiques ayant une MPOC suggère qu'il existe des anomalies métaboliques chez ces gens.<sup>152</sup> La perte de poids dans la MPOC pourrait être consécutive à l'augmentation de la dépense énergétique qui n'est pas adéquatement compensée par la consommation de nutriments. Lorsque les réserves énergétiques sont épuisées, les muscles squelettiques sont dégradés afin de fournir les nutriments nécessaires.<sup>153</sup> Une étude avec des patients ayant une MPOC, a démontré que l'appétit est réduit de 45 % chez les personnes cachectiques comparativement à celles ayant une masse corporelle normale.<sup>154</sup> De fortes corrélations ont également été établies entre l'appétit et l'indice de masse corporelle, la perte de poids, la résistance aux hormones de croissance et le déséquilibre anabolisme/catabolisme.<sup>154</sup> Les résultats de cette étude suggèrent que la diminution de l'appétit pourrait être impliquée dans la dysfonction musculaire.

155

Une des stratégies utilisées pour contrer le déficit énergétique dans cette population est la supplémentation nutritionnelle au régime alimentaire. Par contre, cette supplémentation chez les patients ayant une MPOC n'a peu ou pas d'effet significatif sur la masse musculaire de ces patients.<sup>156</sup> Malgré la pertinence de l'hypothèse du déficit énergétique, elle ne peut expliquer à elle seule l'atrophie musculaire observée dans la MPOC.

#### **1.2.4 Stress oxydatif/inflammation**

Plusieurs modèles montrent qu'il existe un lien de causalité entre l'inflammation et la dysfonction musculaire.<sup>157</sup> De même, le stress oxydatif est capable d'induire la dégradation des protéines contractiles, un phénomène conduisant à l'atrophie musculaire.<sup>158</sup> Les facteurs reliés à l'inflammation et suspectés de contribuer à ce processus sont SAA1, IL-6, TNF, l'IL-1 $\beta$  et les ROS.

Les protéines de phases aiguës, dont font partie la CRP et SAA1, peuvent directement ou indirectement mener à la dégradation des protéines musculaires. SAA1 est une apolipoprotéine qui est impliquée dans le transport du cholestérol et le métabolisme des lipides. Le niveau de SAA1 peut augmenter de manière significative lors d'épisodes inflammatoires, correspondant à des niveaux de 1000 mg/ml dans le sang, suggérant une implication à court terme pour cette protéine lors d'une infection. Son rôle précis dans la défense de l'hôte est toujours mal connu, mais inclurait l'induction d'enzyme pouvant dégrader la matrice extracellulaire et le recrutement de cellules inflammatoires au site d'infection. Les médiateurs responsables de la translocation des signaux de SAA1 sont méconnus dans le tissu musculaire, mais il semble que SAA1 pourrait agir de concert avec IL-6 afin d'inhiber la voie de l'IGF/PI3K/Akt et favoriser la dégradation des protéines.<sup>159</sup>

La famille des protéines des "Signal Transducer and Activator of Transcription" (STAT) est activée en réponse à des signaux extracellulaires comme les cytokines, les facteurs de croissance et les hormones de croissance.<sup>160</sup> IL-6 fait partie des cytokines qui agissent via la voie des Janus Kinases (JAKs) qui conduisent au recrutement et l'activation de Stat3.<sup>161</sup> L'activation de Stat3 induit la transcription des gènes impliqués dans les processus de prolifération, d'apoptose, d'inflammation et de la réponse immune.<sup>162</sup> Plusieurs études ont démontré que Stat3 est le principal facteur de transcription responsable de l'augmentation de SAA1 et de CRP lors d'une période d'inflammation.<sup>163;164</sup> Stat3 agit sur le promoteur de SAA1 via la formation d'un complexe contenant Stat3, NF- $\kappa$ B p65 et p300, ce qui contribue à l'augmentation de l'expression de SAA1.<sup>165;166</sup> SAA1 n'a pas été, à ce jour, directement associée à la dégradation des protéines musculaires, mais son action sur les autres cytokines pourrait y conduire.

Le TNF est la cytokine associée le plus souvent à l'atrophie musculaire consécutive à l'inflammation pulmonaire.<sup>167</sup> Le TNF augmente l'activité

transcriptionnelle du Nuclear Factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) menant à l'augmentation de la dégradation de protéines contractiles via la voie de l'ubiquitine protéasome<sup>168;169</sup>. D'ailleurs, des souris transgéniques surexprimant du TNF au niveau pulmonaire présentent une atrophie musculaire périphérique. Cette perte de masse musculaire démontre la possible contribution de cette cytokine dans la dysfonction musculaire<sup>170</sup>. Des patients cachectiques ayant une MPOC démontrent une concentration plasmatique accrue de TNF.<sup>171;172</sup> De plus, le TNF peut agir directement sur les cellules musculaires en induisant la dégradation protéique tel que démontré *in vitro* sur des lignées cellulaires.<sup>173</sup> Une des hypothèses avancées suggère que le TNF produit au niveau pulmonaire pourrait se répandre aux tissus périphériques. Les mécanismes impliqués dans ce phénomène sont inconnus mais mèneraient à la dégradation des protéines et à la dysfonction musculaire chez les patients ayant une MPOC.

La seconde cytokine pro-inflammatoire suspectée de jouer un rôle dans la perte de masse musculaire chez les personnes ayant une MPOC est l'IL-1 $\beta$ . Une forte association a été démontrée entre la proportion de sujets cachectiques dans une cohorte de patients ayant une MPOC et le polymorphisme à la position -511 du gène d'IL-1 $\beta$ .<sup>174</sup> Cependant, la concentration sérique de cette cytokine n'a pu être déterminée chez ces personnes remettant en question son rôle dans le processus d'atrophie.

Une augmentation du niveau de l'IL-6 a été montrée dans le sérum de patients ayant une MPOC comparativement à des sujets contrôles.<sup>175</sup> Mais le rôle potentiel des interleukines sur la dégradation protéique reste à être démontré. De plus, l'IL-6 tout comme le TNF et l'IL-1 $\beta$  peuvent altérer la régénération musculaire affectant l'homéostasie du tissu musculaire. En effet, ces cytokines peuvent altérer le processus de différenciation par la déstabilisation de la protéine MyoD si l'inflammation persiste au-delà des premières phases de réparation tissulaire.

Le stress oxydatif, tout comme l'inflammation pourrait causer l'atrophie musculaire par divers mécanismes. L'apoptose nucléaire des fibres musculaires est le premier mécanisme pouvant être induit par le stress oxydatif et l'inflammation.<sup>176</sup> Bien qu'un niveau basal de radicaux libres est nécessaire à certains processus cellulaires en conditions physiologiques, un niveau excessif engendre des dommages aux différentes composantes cellulaires. Une augmentation de la quantité de protéines endommagées par le stress oxydant est associée avec un accroissement de la protéolyse par le protéasome. En effet, il a été établi que des myotubes de C2C12 mis en présence de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pendant 24 heures présentent une augmentation de la dégradation protéique combinée à une augmentation de l'activité du protéasome. Ces observations ont été corroborées par une hausse de l'ubiquitination et par une surexpression des ARNm de la polyubiquitine, de MuRF1 ainsi que d'Atrogin-1 dans des myotubes de souris en réponse à du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Suite à un entraînement, on observe une augmentation comparable des niveaux de stress oxydatifs produits dans les muscles périphériques des sujets ayant une MPOC comparativement à des sujets contrôles. Par contre, le stress oxydatif y perdure plus longtemps chez les sujets ayant une MPOC comparativement aux sujets contrôles ce qui pourrait engendrer davantage de dommages cellulaires au niveau des muscles.

L'inflammation et le stress oxydatif sont deux phénomènes physiologiques qui peuvent en partie expliquer la dysfonction musculaire par l'activation du système de l'ubiquitine-protéasome.<sup>177</sup> L'intérêt envers ces processus provient du fait que le tissu pulmonaire des patients atteints de la MPOC est inflammé. Cependant, les évidences de la propagation de l'inflammation des poumons aux muscles restent à être démontrées. Une modification locale du profil de cytokines peut amener une réponse inadéquate des cellules satellites qui s'activent, prolifèrent et se différencient en fonction des cytokines présentes dans leur milieu et ultimement altérer le processus de régénération musculaire.

### 1.2.5 Déficit hormonal

Le déséquilibre entre les facteurs anaboliques et cataboliques est une hypothèse qui a souvent été avancée pour expliquer l'atrophie musculaire observée chez certains patients ayant une MPOC. <sup>178;179</sup>

Une inhibition importante de la synthèse protéique conduisant ultimement à l'atrophie musculaire peut être causée par une diminution des facteurs anaboliques. Il s'agit d'un phénomène observé dans différentes conditions reliées à une atrophie musculaire telles que le vieillissement <sup>180</sup>, l'inactivité <sup>181</sup>, l'hypoxémie chronique <sup>182;183</sup> et l'inflammation chronique. <sup>184</sup> La réponse anabolique des cellules musculaires est principalement modulée par les hormones anaboliques comme la testostérone, la déshydroépiandrostérone (DHEA), et l'hormone de croissance (GH) via IGF-I. <sup>185-187</sup> Par exemple, une diminution de la testostérone circulante chez des sujets masculins a été observé au cours du vieillissement normal <sup>188</sup> mais aussi en présence d'une maladie chronique. <sup>189</sup> Une étude a associé la diminution de la force musculaire avec de faibles niveaux de testostérone circulante. <sup>190</sup> Ce déficit en testostérone, combiné à de la fatigue ou une diminution d'énergie, est un phénomène fréquemment observé dans la MPOC. <sup>191;192</sup> Par ailleurs, un supplément en testostérone a permis d'augmenter la masse et la force musculaire des sujets ayant une MPOC, démontrant l'intérêt de la supplémentation hormonale chez ces patients. <sup>193</sup> Par ailleurs, les hormones peuvent activer et stimuler les cellules satellites durant leur phase de prolifération et de différenciation. De fait, la prise de testostérone permet d'augmenter la masse musculaire principalement par l'augmentation de la synthèse protéique mais également à cause d'une plus grande activation des cellules satellites chez des hommes en santé. <sup>194</sup>

Une diminution généralisée des facteurs anaboliques chez les patients ayant une MPOC comparativement à des sujets d'âges similaires avec des fonctions pulmonaires normales peut engendrer l'initiation de l'atrophie

musculaire et nous pouvons postuler que ce mécanisme engendre une diminution de l'activation des cellules satellites.

### **1.2.6 Hypoxémie**

Compte tenu de l'obstruction pulmonaire et de la destruction alvéolaire caractérisant la MPOC, les patients atteints de cette pathologie sont sujets à subir des épisodes hypoxémiques. L'hypoxémie et l'hypoxie tissulaire qui en résulte sont régulièrement citées comme facteurs potentiels participant au processus d'atrophie musculaire qui accompagne la MPOC. L'hypoxie chronique peut causer une diminution de la masse musculaire des alpinistes lors d'une expédition à plus de 5000 m d'altitude. Après huit semaines en altitude, les participants subissent une perte d'environ 10 % de leurs masses musculaires.<sup>195</sup>

Notre laboratoire a démontré que l'hypoxie chronique cause une diminution de la synthèse protéique par la voie de signalisation de l'IGF/PI3K/Akt en plus d'augmenter la dégradation protéique via la voie de l'ubiquitine-protéasome.<sup>196</sup> L'hypoxie peut également affecter la régénération musculaire en inhibant la différenciation des myoblastes par la dégradation du facteur de transcription MyoD, responsable en partie de ce processus.<sup>197</sup> La diminution locale en oxygène peut également conduire à une inflammation locale contribuant à l'atrophie musculaire.<sup>198</sup> Bien que les patients ayant une MPOC aient souvent des degrés faibles à modérés d'hypoxémie, nous pouvons raisonnablement postuler que ce mécanisme peut participer au développement de l'atrophie musculaire.

L'hypoxémie ne peut cependant pas entièrement expliquer l'atrophie musculaire puisque certains patients en processus d'atrophie ne souffrent pas d'hypoxémie.

### 1.2.7 Régénération musculaire

Le muscle squelettique est principalement formé de cellules multinuclées hautement différenciées, les myotubes. En périphérie des fibres musculaires, on retrouve les cellules satellites. Celles-ci constituent la principale source de cellules responsables du maintien, de l'hyperplasie et de la régénération des muscles squelettiques au cours de la vie adulte.<sup>199</sup>

Les cellules satellites sont activées suite à des bris ou à des dommages, lesquels induiront la relâche de signaux dans l'environnement.<sup>200;201</sup> Suite à leur activation, les cellules satellites devenues myoblastes, prolifèrent et se différencient en myotubes pour réparer ou former une nouvelle fibre musculaire telle que présentée à la figure 1.6.<sup>202</sup> Une anomalie dans un de ces processus rendra le mécanisme de régénération musculaire déficient et pourrait atténuer la réponse à l'entraînement dans la MPOC. Par exemple, les patients ayant une MPOC démontrent des gains de force musculaire équivalents à 70% de la force musculaire de sujets sains lors un programme de réadaptation de 8 semaines.<sup>203</sup> De plus, après un entraînement de 10 semaines, les patients ayant une MPOC sans supplément de testostérone ont gagné 0.1 kg de masse maigre, alors que les patients recevant la testostérone ont montré des gains de 2.3 kg de masse maigre.<sup>204</sup> Plusieurs facteurs peuvent limiter les gains de force et de masse musculaire chez les patients ayant une MPOC participant à un programme d'exercice en résistance. Parmi ces facteurs on peut compter une réponse inadéquate des cellules satellites et une diminution de la signalisation des voies hypertrophiantes.

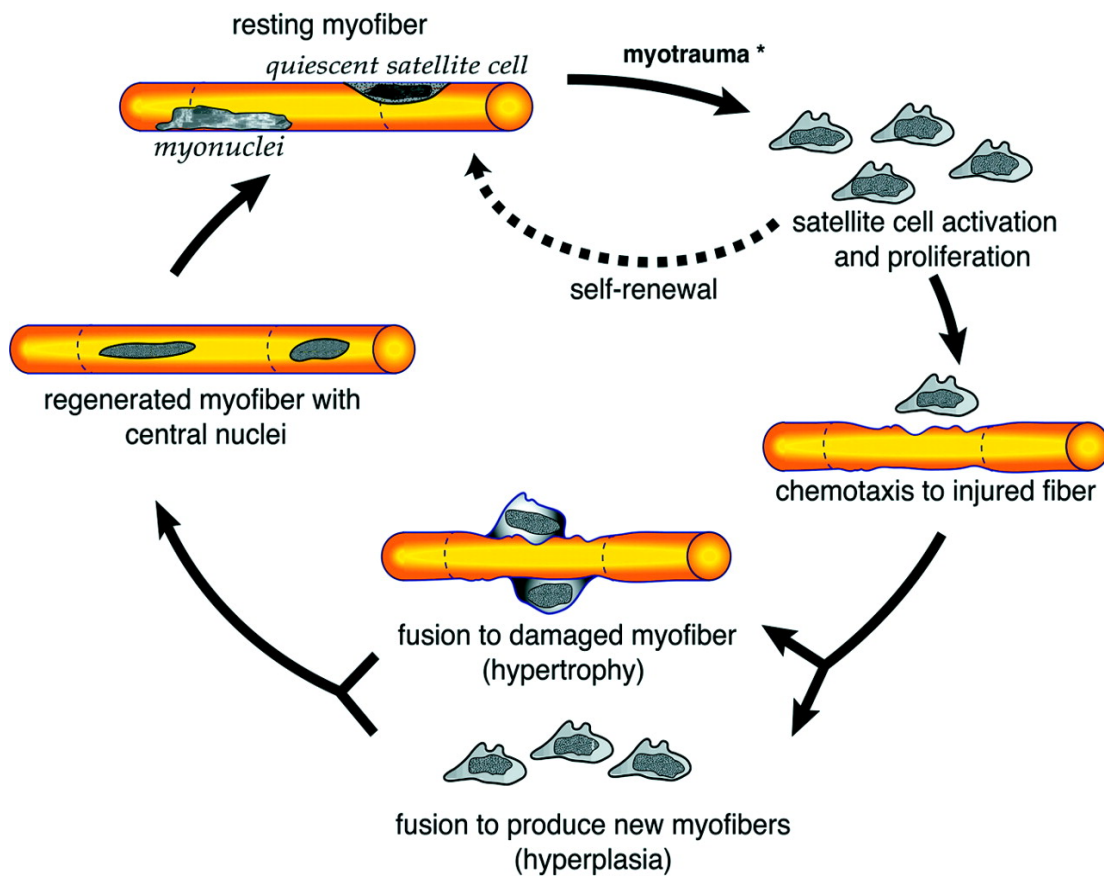


Figure 1.6 Activation et prolifération des cellules satellites <sup>205</sup>.

Étant donné les bénéfices physiologiques et psychologiques des programmes de réadaptation dans la MPOC, des études portant sur la réponse cellulaire à l'exercice sont primordiales afin d'optimiser ces interventions.

Le ou les mécanismes responsables de l'initiation et du développement de l'atrophie musculaire dans la MPOC demeurent débatus. Il est important de mieux comprendre ces différents mécanismes agissant de concert dans l'atrophie musculaire chez les patients ayant une MPOC afin de développer des stratégies visant à réduire leurs effets néfastes sur la capacité fonctionnelle et la qualité de vie des ces sujets atteints.



## **Section 1.3 Cellules satellites**

Avant d'aborder les caractéristiques physiologiques des cellules satellites, une description de la structure du tissu musculaire s'impose. Le muscle squelettique a pour fonction d'assurer le mouvement, la stabilité des articulations, la production de chaleur et une réserve de glucose. Le muscle squelettique constitue environ 40% de notre masse corporelle contribuant à environ 25% de notre métabolisme en plus d'être un important réservoir de protéines.<sup>1</sup>

### **1.3.1 Muscle squelettique**

La structure du muscle squelettique est schématisée à la figure 1.7. La fibre musculaire (myofibre) est l'unité de base du muscle squelettique et s'assemble avec d'autres fibres pour former un faisceau musculaire.<sup>206</sup> Les fibres sont entourées de tissus conjonctifs et regroupées entre elles afin de former un muscle. Les fibres musculaires sont des cellules multinuclées. Les cellules satellites se retrouvent à leur périphérie. Les noyaux musculaires sont également confinés en périphérie de la fibre musculaire.<sup>1</sup> Chacune de ces myofibres contient de nombreuses myofibrilles lesquelles sont constituées d'un arrangement en série et en parallèle de sarcomères. Le sarcomère, unité contractile de base, est composé d'un arrangement de filaments épais et fins.<sup>207</sup> De façon générale, la myosine compose les filaments épais tandis que l'actine compose les filaments fins pour donner naissance aux complexes d'actomyosine.

Pour répondre aux nombreuses et diversifiées tâches physiques quotidiennes, le muscle est composé de plusieurs types de fibres musculaires. Les fibres musculaires sont classées selon le type de myosine qu'elles expriment. Chez l'humain, trois types de fibres coexistent, les fibres I, IIa et IIx.<sup>208</sup> Les fibres de type I ou fibres à contraction lente (slow twitch) démontrent principalement un métabolisme oxydatif pour produire leur

énergie et sont résistantes à la fatigue. Elles sont donc le type de fibre de prédilection des efforts d'endurance, comme la course de longue durée. Les fibres de type Iix, ou fibres à contraction rapide (fast twitch), démontrent principalement un métabolisme glycolytique pour produire leur énergie et sont à prédominance anaérobie. Elles sont donc le type de fibres impliquées dans les efforts de haute intensité et de courte durée. Les fibres Iia, également à contraction rapide, démontrent un métabolisme intermédiaire (oxydatif et glycolytique). Elles sont utiles pour des efforts aussi bien d'endurance que de sprint.<sup>208</sup>

### 1.3.2 Généralités

Les cellules satellites ont été identifiées pour la première fois en 1961 par Alexander Mauro.<sup>209</sup> Elles ont été décrites comme étant des cellules associées à la périphérie des myofibres, d'où l'appellation cellule satellite.

Elles ont été identifiées sur la base de leur localisation, mais également sur le fait qu'elles possèdent un ratio élevé d'hétérochromatine relativement à la proportion d'euchromatine.<sup>210</sup> L'hétérochromatine est de l'ADN transcriptionnellement inactif reflétant l'état de quiescence cellulaire. De fait, les cellules satellites sont retrouvées à l'état de quiescence entre le sarcolemme et la lame basale.<sup>211</sup> Elles comptent pour 2 à 5 % des noyaux retrouvés dans les muscles squelettiques.<sup>212</sup>

Les cellules satellites constituent le principal réservoir de cellules participant à la régénération du tissu musculaire au cours de la vie adulte.<sup>213</sup> Sous l'influence de différents signaux provenant de l'environnement, les cellules satellites s'activent, prolifèrent et expriment des marqueurs myogéniques.<sup>201</sup> Suite à la prolifération, les cellules satellites prennent l'appellation de myoblastes.<sup>214</sup> Trois options se présentent aux myoblastes : 1) retourner à l'état de quiescence pour maintenir la population de cellules satellites constante; 2) fusionner avec une fibre musculaire endommagée afin

de la réparer où; 3) fusionner entre elles pour former une nouvelle fibre musculaire (figure 1.6).<sup>201</sup>

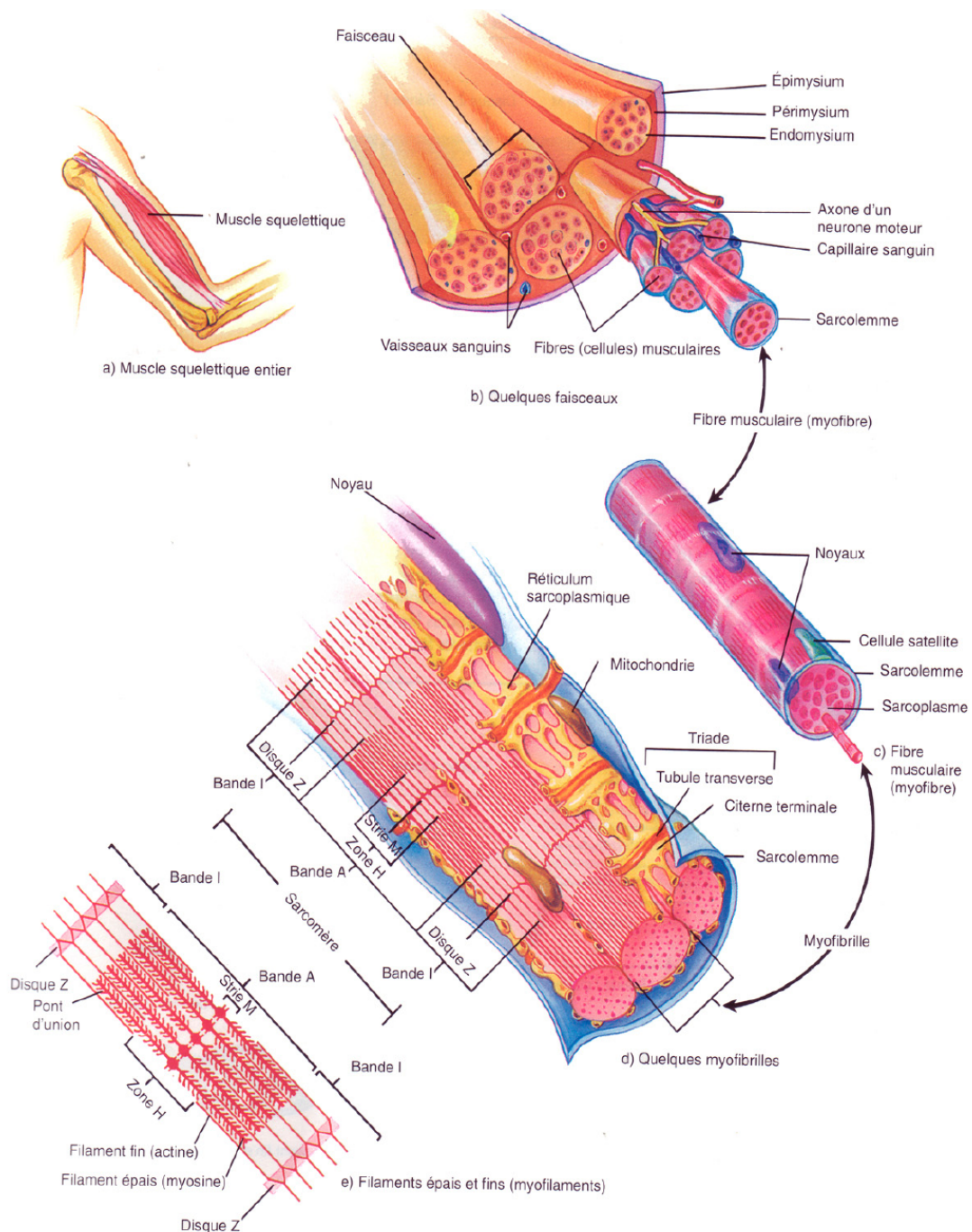


Figure 1.7 Structure macroscopique et microscopique d'un muscle squelettique <sup>1</sup>

La distribution des cellules satellites diffère selon l'âge, le groupe musculaire, le type de fibres et le site topographique étudié sur la fibre. Chez un organisme naissant, les cellules satellites constituent près de 20 % des noyaux dans un muscle donné.<sup>215</sup> Par la suite, leur nombre se stabilise autour de 5 % durant la vie adulte et diminue à environ 2 % chez une personne âgée.<sup>215</sup> Le nombre de cellules satellites varie également selon le groupe musculaire. Les fibres oxydatives contiennent jusqu'à six fois plus de cellules satellites que les fibres glycolytiques.<sup>216</sup> Par exemple, le nombre de cellules satellites dans un muscle oxydatif comme le *soleus* est deux à trois fois plus élevés que dans un muscle glycolytique comme le *tibialis anterior*.<sup>217</sup> De plus, les cellules satellites ont tendance à se regrouper autour des jonctions neuromusculaires<sup>218</sup>, des capillaires<sup>219</sup> et des noyaux des fibres musculaires<sup>220</sup> afin d'assurer une meilleure régulation de leurs activités et favoriser la détection des changements de l'environnement.

### 1.3.3 Formation

L'origine embryonnaire des cellules satellites est toujours controversée. Il a été postulé que les cellules satellites seraient originaires des somites tout comme les myoblastes, chacune constituant une lignée cellulaire distincte.<sup>221</sup>

Durant le développement, les cellules appelées cellules souches myogénique migrent vers les membres inférieurs pendant l'embryogenèse et forment les muscles squelettiques.<sup>222</sup> Lors de l'embryogenèse, les cellules souches myogénique expriment la protéine c-met qui est un marqueur établi des cellules satellites, ajoutant un argument à l'hypothèse que les cellules satellites sont une sous-population des cellules qui migrent et qui forment les muscles.<sup>223</sup> Il est intéressant de noter qu'en l'absence de l'expression de c-met au niveau embryonnaire aucune musculature ne se développe.<sup>224</sup>

Contrairement au postulat précédent, des cellules ayant des propriétés semblables aux cellules souches myogéniques donnant naissance aux cellules satellites ont été isolées hors des somites lors de l'embryogenèse.<sup>225</sup> Ces cellules expriment des marqueurs associés aux cellules endothéliales.<sup>225</sup> Cette observation remet en question l'origine embryonnaire des somites et suggère une origine endothéliale des cellules satellites.

Dernièrement, une expérience a démontré sans équivoque l'origine de la majorité des cellules satellites. Par l'utilisation de la « green fluorescent protein », ils ont décrit le mouvement des cellules des somites au cours de l'embryogenèse.<sup>226</sup> Cette expérience a permis de conclure qu'approximativement 91 à 95 % des cellules qui forment les cellules satellites et qui expriment Pax7 (un facteur de transcription spécifique à ces cellules) proviennent des somites.<sup>226</sup>

De fait, une deuxième population de cellules qui participent à la régénération musculaire a commencé à être étudiée au cours des dernières années.<sup>227</sup> Cette population est appelée « muscle side population » dérivée de cellules pluripotentes, les « muscle-derived stem cells ». <sup>227</sup> Ces cellules auraient la capacité de se différencier en cellules hématopoïétiques, capable de produire toutes les lignées des cellules sanguines <sup>228</sup>, en plus de pouvoir produire des cellules hépatiques <sup>229</sup>, des cellules musculaires cardiaques <sup>230</sup>, des cellules endothéliales vasculaires <sup>231</sup> et différents types de cellules épithéliales.<sup>232</sup> Dans un modèle murin irradié, qui inactive toutes les cellules souches, une injection de « muscle-derived stem cells » a permis de reconstituer le répertoire complet de cellules hématopoïétiques.<sup>227</sup> Lors d'une deuxième expérience, où des cellules de la « muscle side population » ont été injectées dans un muscle, ces dernières ont participé activement à la régénération musculaire par la formation de myotubes.<sup>233</sup> Ces différents constats démontrent l'existence d'une deuxième population de cellules distinctes et différentes des cellules satellites.

De façon générale, les cellules satellites et les myoblastes seraient dérivés de deux lignées des « mesodermal precursor cells » provenant des somites. Toutes ces expériences démontrent la possibilité que les cellules musculaires progénitrices comprenant les cellules satellites soient une population hétérogène avec différentes sous-populations.

### **1.3.4 Activation**

Les blessures musculaires sont caractérisées par une désorganisation des filaments d'actomyosine et un déchirement du sarcolemme. Ces déchirures augmentent la perméabilité de la membrane causant un influx intracellulaire de calcium et la libération extracellulaire de créatine kinase.<sup>234</sup> L'augmentation du calcium intracellulaire est responsable de l'activation des calpaïnes, des protéases dont l'activité est dépendante du calcium.<sup>235</sup> L'activation de ces protéases engendre une désorganisation de l'architecture des fibres musculaires.<sup>236</sup> Au site endommagé, il y a une infiltration séquentielle de neutrophiles et de monocytes, précurseurs des macrophages.<sup>237</sup> Les cytokines relâchées dans l'environnement par le tissu nécrotique sont un signal chimiotactique pour ces cellules.<sup>238;239</sup> Les neutrophiles sont le premier type cellulaire à envahir le site endommagé avec une augmentation significative de leur nombre dans les six premières heures suite à la blessure.<sup>240</sup> Dans les 48 heures suivant la blessure, les macrophages deviennent le type cellulaire dominant et se chargent de phagocyter les débris cellulaires en plus d'activer la régénération cellulaire.<sup>241</sup> La libération de certaines cytokines et de facteurs de croissance stimule la régénération tissulaire via l'activation des cellules satellites.<sup>242</sup>

L'étape initiale de la régénération musculaire est l'activation et la prolifération des cellules satellites.<sup>243</sup> L'inhibition de ces activités par la colchicine (inhibiteur de la division mitotique) ou l'irradiation démontre l'importance de celles-ci dans la capacité de régénération du tissu

musculaire.<sup>244;245</sup> L'ensemble des nouveaux noyaux provenant des cellules satellites se répartit entre la régénération des fibres endommagées et la formation de nouvelles fibres.<sup>246-248</sup> Les fibres nouvellement formées/réparées sont morphologiquement plus petites et leurs noyaux sont centraux.<sup>249</sup> Ces fibres toujours immatures ont tendances à être basophiles reflétant le haut niveau de synthèse protéique.<sup>250</sup> De plus, ces nouvelles fibres expriment spécifiquement la chaîne lourde de myosine embryonnaire.<sup>251</sup> La migration des noyaux centraux vers la périphérie confirme la maturité des nouvelles fibres. L'hypertrophie des fibres vers un volume similaire aux fibres existantes termine le processus.<sup>252</sup>

#### **1.3.4.1 Signaux d'activation**

Il existe une panoplie de signaux (hormones, cytokines, neurotransmetteurs et facteurs de croissance) capable d'activer les cellules satellites comme illustré à la figure 1.8. Ces signaux proviennent du système immunitaire, du système vasculaire, du système nerveux et de manière autocrine par les cellules satellites elles-mêmes. Ces facteurs favorisent l'activation, la prolifération et la multiplication des cellules satellites. Par ailleurs, ces facteurs sont capables d'attirer et d'activer les cellules satellites qui ont établi leur niche plus loin sur une fibre musculaire afin de venir participer à la régénération musculaire.<sup>253;254</sup>

Le premier facteur de croissance capable d'induire l'activation des cellules satellites est l'« Hepatocyte Growth Factor » (HGF).<sup>255</sup> Le HGF a comme récepteur la protéine c-met qui est exprimée sur les cellules souches myogéniques durant l'embryogenèse et sur les cellules satellites au stade adulte. La concentration de ce facteur de croissance est proportionnelle au degré de sévérité de la blessure<sup>255</sup>. Le HGF stimule la multiplication des cellules satellites en favorisant leur entrée dans le cycle cellulaire en plus d'inhiber la différenciation cellulaire.<sup>256;257</sup> Il faut savoir que les cellules

satellites suite à leur activation effectuent plusieurs rondes de multiplication sans se différencier afin de produire un nombre adéquat de myoblastes, d'où l'importance d'inhiber la différenciation. <sup>258</sup> Le HGF est également un chimioattractant favorisant la migration des cellules satellites vers les fibres endommagées, ainsi que la régénération musculaire via l'activation des cellules satellites. <sup>255;259-262</sup>

Les muscles squelettiques sécrètent l' « Insulin-like growth factor » (IGF-1 et -2), deux facteurs de croissance important dans la régulation de la régénération musculaire. <sup>263-265</sup> Ils favorisent la prolifération et la différenciation des cellules satellites en plus de participer à la réponse hypertrophique des muscles par l'augmentation de la synthèse protéique. <sup>266-268</sup> L'importance d'IGF-1 dans la régénération musculaire a été démontrée chez des souris âgées. Chez des souris blessées, l'injection d'IGF-1 à ce site augmente leur capacité de récupération en plus d'augmenter leur masse

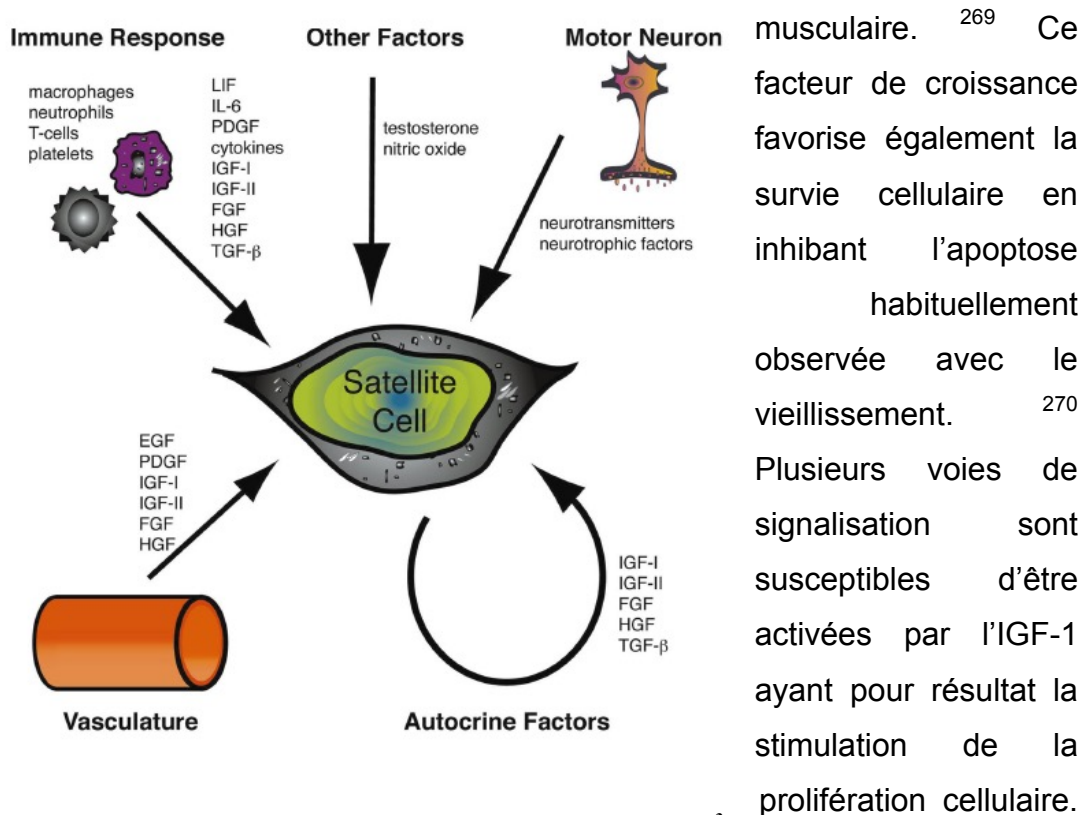


Figure 2.8 Multiples signaux d'activation des cellules satellites <sup>3</sup>

musculaire. <sup>269</sup> Ce facteur de croissance favorise également la survie cellulaire en inhibant l'apoptose habituellement observée avec le vieillissement. <sup>270</sup> Plusieurs voies de signalisation sont susceptibles d'être activées par l'IGF-1 ayant pour résultat la stimulation de la prolifération cellulaire. Ces voies sont



essentiellement celles de la PI3K (Akt, mTOR) et des « Mitogen-activated protein » (MAP/ERK).<sup>271-274</sup>

Le « Fibroblast Growth Factor » (FGF) est un facteur de croissance important lors des premiers stades d'activation des cellules satellites.<sup>275-277</sup> On retrouve neuf isoformes de ce facteur de croissance dont la majorité favorise la prolifération des cellules satellites en plus d'avoir un effet synergique lorsque couplé au HGF.<sup>278</sup> Tout comme le HGF, le FGF favorise la prolifération et la multiplication des cellules satellites en inhibant la différenciation.<sup>279;280</sup> Chez des souris adultes déficientes en FGF-6, une isoforme spécifique au muscle squelettique, on observe une défaillance dans la prolifération des cellules satellites conduisant à une altération de la régénération musculaire.<sup>281</sup> Le FGF induit préférentiellement l'activation de la voie de signalisation des MAP/ERK kinases afin de promouvoir la prolifération des cellules satellites.<sup>282</sup>

Certains membres du groupe des « Transforming Growth factors- $\beta$  » (TGF- $\beta$ ) exercent des effets sur les cellules satellites. Leurs signaux sont transmis par la voie de signalisation impliquant les différentes protéines de la famille des SMAD.<sup>283</sup> Une fois activées, ces protéines transloquent au noyau pour transcrire les gènes cibles.<sup>284</sup> De manière générale, les membres de la famille du TGF- $\beta$  exercent un effet d'inhibition sur la prolifération et la différenciation des cellules satellites.<sup>285-287</sup> Ces facteurs agissent en atténuant l'activation de la myogenèse par l'inhibition de l'expression des facteurs de transcription tels que MyoD.<sup>288</sup> Les membres de la famille du TGF- $\beta$  sont généralement exprimés à la fin du processus de régénération afin d'empêcher une réponse hypertrophique exagérée.<sup>289</sup> Un membre important de cette famille est la myostatine qui est spécifiquement exprimée dans le muscle.<sup>290</sup> Elle régule négativement la masse musculaire par des mécanismes qui restent à éclaircir. Cependant, l'absence ou le blocage de l'activité de la myostatine conduit à une importante hypertrophie musculaire

notamment par l'augmentation de l'activité des cellules satellites.<sup>291</sup> À l'inverse, lorsqu'on augmente son expression, une importante atrophie musculaire est observée. Ce phénomène serait lié à l'inhibition de l'activation des cellules satellites et à la stimulation de la dégradation des protéines contractiles.<sup>292</sup>

La dernière cytokine abordée est l'interleukine-6 (IL-6) qui est produite par divers types cellulaires incluant les myoblastes et les macrophages.<sup>293</sup> L'IL-6 induit la synchronisation du cycle cellulaire des cellules satellites, la dégradation du tissu endommagé, et l'apoptose des macrophages à la fin de la régénération afin d'éviter un processus inflammatoire exagéré.<sup>294</sup> Plusieurs autres facteurs sont capables d'induire l'activation et la prolifération des cellules satellites. Parmi ces facteurs on retrouve l'oxyde nitrique (NO)<sup>295</sup>, le « Platelet-derived growth factors (PDGF)»<sup>296</sup>, « l'Endothelial-derived growth factors (EGF)»<sup>297</sup> et la testostérone.<sup>298</sup>

L'activation des cellules satellites est un processus finement régulé qui nécessite l'intervention de plusieurs cytokines et facteurs de croissance provenant de leur environnement.

#### **1.3.4.2 Myogenèse**

La myogenèse inclue les étapes durant lesquelles une cellule souche myogénique progresse pour devenir une cellule musculaire. Ces stades cellulaires sont : la cellule souche myogénique, la cellule satellite, le myoblaste, le myotube et la fibre musculaire.<sup>299</sup> Au niveau embryonnaire, les cellules souches myogéniques se déterminent en cellules satellites et établissent résidence dans les muscles à l'état de quiescence au stade adulte.<sup>222</sup> Suite à un signal d'activation, les cellules satellites prolifèrent en myoblastes pour éventuellement se différencier en myotubes. Plus tard, ces myotubes fusionnent entre eux afin de former une nouvelle fibre musculaire qui est l'unité de base d'un muscle.<sup>300</sup>

Au niveau embryonnaire deux voies de signalisation sont impliquées dans la progression des cellules souches myogéniques vers le stade de cellule satellite. Ce processus est du ressort de la voie de signalisation Notch et de la voie du Wnt.<sup>301</sup> Au niveau adulte, ces voies seront également responsables du contrôle de la myogenèse lors de l'activation des cellules satellites.<sup>302;303</sup> L'activation et la prolifération des cellules satellites feront principalement intervenir la voie Notch qui contrôle l'induction des facteurs de transcriptions spécifiques aux cellules satellites tels que Pax7 et Pax3.<sup>304;305</sup> GSK3 $\beta$  se lie directement au domaine intracellulaire de Notch afin de favoriser sa signalisation. De fait, une augmentation de la signalisation de Notch correspond à un niveau et une activité élevée de GSK3 $\beta$ . Afin d'entamer la différenciation et la maturation des cellules musculaires une transition entre la voie de Notch et la voie de Wnt est nécessaire. Pour ce faire, GSK3 $\beta$  doit être inactivé et Numb, un inhibiteur de Notch, doit bloquer la signalisation induite par Notch. Cette transition vers Wnt est nécessaire pour induire la transcription des régulateurs myogéniques tardifs afin de compléter la myogenèse.<sup>306</sup>

La protéine Pax7 est membre de la famille des facteurs de transcription « paired-box » impliqués dans le développement des muscles squelettiques<sup>307</sup>. Ce facteur de transcription est responsable de la spécification des cellules satellites en myoblastes et est exprimé dans ces cellules tant à l'état de quiescence que lorsqu'elles sont activées.<sup>308</sup> Pax3 est un autre membre de cette famille et est pour sa part responsable de la régulation de la spécification des cellules souches myogéniques en cellules satellites dans les somites durant l'embryogenèse.<sup>309</sup>

L'expression de Pax7 a été associée avec les noyaux centraux des fibres nouvellement formées suggérant que les cellules satellites récemment activées et participant à la régénération sont du ressort des cellules sous le contrôle de ce facteur de transcription.<sup>311</sup> L'expression de Pax7 est primordiale à la fonction et à la survie des cellules satellites.<sup>310</sup> L'importance

du facteur de transcription Pax7 pour le bon fonctionnement des cellules satellites a été démontrée chez des souris ayant deux allèles désuets du gène Pax7 (Pax7<sup>-/-</sup>).<sup>312</sup> Ces souris naissent normales, mais ne peuvent croître jusqu'au stade adulte avec une diminution de 50 % de leur masse musculaire comparativement à des souris normales âgées de 7 jours. Ces souris transgéniques meurent habituellement après deux semaines. En plus d'avoir une réduction importante de la taille de leurs fibres musculaires, et non pas du nombre de fibres, ces souris n'ont aucune cellule satellite.<sup>313</sup> De plus, on observe une quasi-absence de régénération musculaire chez les souris Pax7<sup>-/-</sup> démontrant que les cellules satellites agissent en tant que système principal pour la régénération des muscles endommagés. L'activation des cellules satellites, par l'entremise de Pax7, est donc essentielle pour induire la prolifération des myoblastes et la régénération musculaire.

La spécification de l'identité des cellules satellites en myoblastes requiert l'activité de MyoD et Myf5, deux facteurs de transcription faisant partie de la famille des « Myogenic Regulatory Factor » (MRF). MyoD et Myf5 sont spécifiquement exprimés durant la phase de prolifération.<sup>314-316</sup> L'augmentation du niveau du facteur de transcription MyoD est un événement qui se déroule durant les 12 premières heures suite à la blessure et est détectable avant tout autre signe de division cellulaire.<sup>317</sup> Il n'est pas encore évident quel facteur essentiel entre MyoD ou Myf5 est exprimé en premier pour l'engagement dans la myogenèse, mais rapidement MyoD et Myf5 seront coexprimées.<sup>318;319</sup> Le facteur de transcription MyoD joue également un rôle important lors de la différenciation. Cette observation est supportée par un modèle de souris MyoD<sup>-/-</sup> chez laquelle une diminution du potentiel de régénération est observée. Spécifiquement, une augmentation du nombre de cellules satellites et une diminution de la formation de myotubes suite à l'induction d'une blessure sont rapportées.<sup>320</sup>

Déterminer le rôle de Myf5 fut une tâche plus ardue puisqu'aucun modèle de souris n'est viable en l'absence de ce facteur.<sup>321</sup> Une hypothèse a émané supportant l'idée qu'il y ait deux lignées de cellules satellites différentes soit celle exprimant MyoD et l'autre Myf5.<sup>322</sup> Cette hypothèse se base sur l'observation qu'une proportion des cellules satellites retourne à l'état de quiescence afin de garder la population constante, généralement la population négative pour Myf5. Les cellules positives pour Myf5, environ 80 % des cellules satellites, vont poursuivre vers la différenciation terminale en cellules musculaires pour participer à la régénération.<sup>323</sup> L'autre lignée se développe plus lentement et retournerait à l'état de quiescence après le processus de multiplication. Deux scénarios ont été retenus pour expliquer comment des cellules ayant les mêmes origines peuvent se comporter différemment. Le premier scénario serait une division asymétrique produisant environ une cellule sur quatre capable de retourner à l'état de quiescence.<sup>324</sup> Le deuxième scénario serait une division symétrique de la cellule-mère, mais parmi les cellules filles certaines seraient capables de se retirer du cycle cellulaire pour retourner au stade de quiescence.<sup>325;326</sup> Actuellement, les observations iraient plus en faveur de la division asymétrique avec le facteur de transcription Myf5 qui aurait un rôle important à jouer dans ce processus.

<sup>325</sup>

Éventuellement, les nouveaux myoblastes amorcent l'expression de deux autres MRF tardifs, la myogénine et MRF4 afin de débiter la différenciation terminale.<sup>327</sup> Une caractéristique des fibres nouvellement formées est la présence de noyaux centraux exprimant MRF4. La maturation des fibres nécessite la migration des noyaux centraux en périphérie de la fibre et l'induction des gènes spécifiques aux cellules musculaires en différenciation terminale qui est du ressort de MRF4.<sup>331</sup> Il s'en suivra l'activation de la protéine p21 qui se chargera de l'arrêt du cycle cellulaire.<sup>328</sup> La différenciation terminale sera complétée par l'expression de gènes spécifiques aux cellules musculaires telle que la chaîne lourde de myosine et éventuellement la fusion à la fibre endommagée.<sup>329;330</sup>

Pour une régénération musculaire complète, les myoblastes doivent fusionner entre eux pour former des myotubes. Cette fusion nécessite l'intervention de protéines membranaires telle que les cadherines qui favorisent les contacts cellules-cellules afin de permettre la différenciation et la fusion des myotubes.<sup>332</sup> D'ailleurs, l'expression de ces protéines est augmentée dans un muscle en phase de régénération musculaire.<sup>333</sup>

La formation, l'activation, la prolifération et la différenciation des cellules satellites sont des phénomènes sous le contrôle de plusieurs facteurs de transcription. La régulation temporelle de ces intervenants mène à la formation d'une cellule musculaire à partir d'une cellule souche myogénique. Chaque intermédiaire est essentiel au bon fonctionnement de la myogenèse et pour le maintien de la masse musculaire.

### **1.3.5 Implication de la régénération musculaire dans l'atrophie musculaire**

La section 1.2.1 a démontré l'importance d'une fine régulation entre la synthèse et la dégradation protéiques pour le maintien de la masse musculaire. Un déséquilibre de cette balance conduit à l'atrophie musculaire. Puisque les cellules satellites sont la principale source de cellules ayant pour rôle le maintien et la régénération du tissu musculaire au cours de la vie adulte, il apparaît plausible qu'un dérèglement de cette fonction puisse contribuer au développement de l'atrophie musculaire. Il existe plusieurs phénomènes qui peuvent conduire à une régénération musculaire déficiente.

#### **1.3.5.1 Altération des capacités intrinsèques des cellules satellites**

Il est généralement accepté que le potentiel de régénération diminue avec le vieillissement d'un individu.<sup>334</sup> Plusieurs études ont relié une altération des capacités intrinsèques des cellules satellites et une diminution

du potentiel de régénération. Une altération au niveau de la capacité proliférative des cellules satellites combinée à une incapacité à se différencier correctement en myotube sont des hypothèses pouvant expliquer une régénération musculaire déficiente.

L'hypothèse d'une diminution du nombre de cellules satellites est difficile à vérifier parce qu'il existe une variation quantitative entre les espèces, le type musculaire, la composition des fibres, et les marqueurs utilisés pour détecter les cellules satellites. De fait, une diminution généralisée de l'expression des marqueurs utilisés pour l'identification des cellules satellites est constatée avec l'âge.<sup>210</sup> Par exemple, dans le muscle *vastus latéralis* humain, une diminution du nombre de cellules satellites a été observée chez des sujets âgés ( $70.8 \pm 1.3$  ans) comparativement à des sujets jeunes ( $28.7 \pm 2.3$  ans).<sup>335</sup> Toutefois, les conséquences fonctionnelles du déclin du nombre de cellules satellites sur la capacité régénérative sont incertaines.

En effet, une cellule satellite soumise à un environnement adéquat et à des stimuli appropriés sera en mesure de produire suffisamment de cellules musculaires pour réparer le muscle comme démontré dans une étude ayant transplanté des muscles de souris âgées dans des souris jeunes.<sup>336</sup> Les auteurs ont pratiqué une intervention visant à transférer des muscles (*extensor digitorum longus*) provenant de souris âgées dans des souris jeunes. Suite à la transplantation, le pourcentage de cellules satellites activées était quatre fois plus important dans les muscles âgés transplantés dans les souris jeunes que dans les souris contrôles. Deux mois après la transplantation, les souris jeunes ayant subi une autotransplantation, et servant de contrôle à l'intervention, avaient une masse musculaire de 67 % relativement à la masse musculaire des souris jeunes sans intervention. Cependant, les muscles de souris âgées transplantés dans les souris jeunes avaient une masse de 144% relativement aux souris âgées n'ayant pas subi d'intervention<sup>337</sup>. Cette dernière expérience démontre que même dans un

muscle en processus d'atrophie où les cellules satellites sont peu actives, remplacer le muscle dans un environnement favorable rétablit leurs potentiels d'activation et de régénération.

Une diminution du niveau d'activation des cellules satellites suite à un stimulus ou à une blessure peut considérablement réduire le potentiel de régénération. Cette diminution du niveau d'activation est fréquemment observée dans la sarcopénie.<sup>338</sup> À la suite d'une blessure, l'inflammation persiste pendant environ 48 heures, si les cellules satellites à ce site ne s'activent pas durant cette période, les signaux d'activation disparaissent. Cette période est critique pour l'activation des cellules satellites et une diminution du nombre de cellules satellites activées peut considérablement réduire la capacité de régénération du tissu musculaire.

Une incapacité à se différencier en myotube et fusionner correctement aux fibres musculaires est une autre hypothèse reliant l'atrophie musculaire et l'altération du potentiel de régénération. Ce dernier phénomène est observé dans la sarcopénie<sup>339</sup> et dans les dystrophies musculaires.<sup>340;341</sup> L'étape culminante d'une cellule satellite consiste à former un myotube et fusionner en fibre musculaire. Une incapacité à se différencier en myotube rend inutile la prolifération des cellules satellites pour réparer le tissu musculaire puisqu'elles seront incapables de former de nouvelles unités contractiles.

De plus, la progression d'une cellule satellite vers un myotube nécessite l'intervention des différents MRF précédemment cités. Le TNF peut altérer le processus de différenciation par la déstabilisation de la protéine MyoD tel que démontré dans un modèle de souris ayant une inflammation pulmonaire.<sup>342;343</sup> La protéine MyoD est un facteur de transcription essentiel à la progression d'une cellule satellite vers un myotube et la déstabilisation de cette protéine est responsable d'une diminution de son niveau d'activité. La baisse de son niveau d'activité diminue le nombre de cellules satellites et conséquemment diminue le potentiel de régénération musculaire.



L'altération des capacités intrinsèques des cellules satellites peut se traduire par une incapacité à s'activer, à proliférer et à se différencier normalement. Un délai dans l'activation combiné avec une incapacité à proliférer et à se différencier correctement est une hypothèse avancée pour expliquer une diminution de la régénération musculaire.

### **1.3.5.2 Environnement des cellules satellites**

L'environnement dans lequel se retrouvent les cellules satellites est primordial, puisque l'activation de ces cellules est consécutive à la détection des signaux d'activations qu'elles percevront de leur milieu.

Une expérience effectuée en 2005 a démontré hors de tout doute l'importance de facteurs, non identifiés, présents dans la circulation sanguine sur l'activité des cellules satellites. Le design expérimental consistait à relier le système vasculaire de deux souris entre elles pour qu'elles deviennent un système circulatoire unique.<sup>344</sup> Lorsqu'il s'agit d'un pairage parabiotique hétérochronique (souris jeune avec souris âgée) ou isochronique (deux souris jeunes), le potentiel de régénération est conservé chez les jeunes souris ou est restauré chez les souris âgées. Lorsqu'il s'agit d'un pairage isochronique (deux souris âgées), il y a quasi absence de régénération. Donc, avec l'âge les cellules satellites conservent leur potentiel de régénération, mais la présence de facteurs inhibiteurs et/ou la diminution des facteurs activateurs dans l'environnement sont responsables de la diminution de l'activité de cellules satellites.<sup>345</sup> Il est possible que l'inflammation systémique probablement présente dans la MPOC puisse rendre l'environnement inadéquat pour l'activité des cellules satellites.<sup>346</sup> L'inflammation est un signal d'activation nécessaire pour l'activation des cellules satellites tel que démontré dans une étude dans laquelle des sujets utilisant des anti-inflammatoires avaient une absence de régénération musculaire suite à un exercice.<sup>347</sup> À l'opposé, une trop grande concentration

de cytokines inhibe l'initiation de la différenciation des cellules musculaires récemment activées.<sup>348</sup> De fait, la réponse des cellules musculaires au TNF via la voie du NF- $\kappa$ B réduit considérablement l'expression de MyoD et l'accumulation de la chaîne lourde de myosine.<sup>349</sup>

L'environnement dans lequel se retrouvent les cellules satellites est primordial pour leur activation. Un déséquilibre anabolique, une trop grande concentration de cytokines inflammatoires ou de cellules infiltrantes peuvent modifier l'environnement local et altérer la réponse des cellules satellites.

#### ***1.3.5.3 Altération des voies de signalisation spécifiques aux cellules satellites***

Chaque organisme est doté d'une durée de vie cellulaire dépendante des capacités de régénération de ses organes et de ses tissus. Une altération des voies de signalisation spécifiques aux cellules satellites peut diminuer le potentiel de régénération des muscles squelettiques. Avec l'âge, on observe une diminution de cette capacité par une diminution de l'activation des voies de signalisation de Notch et Wnt.<sup>350;351</sup>

La diminution du potentiel de régénération observée avec l'âge a jusqu'à présent été associée avec le déclin des fonctions des cellules satellites.<sup>352</sup> Avec l'âge, il y a une réduction marquée de l'activation et de la prolifération des cellules satellites conduisant à une altération de la régénération musculaire.<sup>353</sup> De tels changements intrinsèques dans les fonctions des cellules satellites acquises avec l'âge ou reliées à une activation importante et continue pourraient être responsables de la diminution du potentiel de régénération. L'activation et la prolifération des cellules satellites dans la voie myogénique sont dépendantes de l'expression de gènes spécifiques à la lignée musculaire. Les voies de signalisation Notch et Wnt contrôlent la progression des cellules satellites en cellules musculaires suite à leurs activations.<sup>352</sup> Des altérations au niveau des intermédiaires de

ces voies ont été observées dans la perte de masse musculaire reliée à la sarcopénie.<sup>354</sup> De fait, les ligands du récepteur Notch, Delta-like-1 et Jagged1, ont une expression atténuée dans les muscles de personnes âgées comparativement à des sujets jeunes.<sup>355</sup> De plus, chez des souris âgées, le simple fait d'induire l'activation de la voie Notch par Delta-like-1 permet de rétablir l'activation des cellules satellites et la myogenèse comme celle observée chez des souris jeunes suite à une blessure.<sup>356</sup> Dans la sarcopénie, le délai dans l'activation des cellules satellites résulte en une diminution de la régénération musculaire associée avec l'âge.<sup>357;358</sup>

Une fine régulation temporelle de ces deux voies, Notch et Wnt, est nécessaire pour amener une cellule satellite à former un myotube et réparer le muscle. L'âge, tout comme une condition modifiant l'environnement systémique, est susceptible d'altérer cette régulation et la régénération musculaire. Une réponse déficiente de la régénération musculaire pourrait conduire au développement d'une atrophie musculaire.

#### ***1.3.5.4 Augmentation de l'apoptose cellulaire***

L'apoptose des cellules satellites a pour l'instant été démontrée dans la sarcopénie et la dénervation, deux conditions causant une sévère atrophie musculaire.<sup>359-361</sup> L'apoptose est un processus responsable de la mort préprogrammée de cellules intactes afin de conserver l'homéostasie entre la croissance et la mort cellulaire.

L'apoptose est un phénomène beaucoup moins décrit dans les tissus multinucléés en différenciation terminale tels que les muscles squelettiques. Cependant, l'activation de l'apoptose et la signalisation associée ont toutes deux été identifiées dans différentes conditions conduisant à l'atrophie musculaire. Une hypothèse a été émise faisant mention que chaque noyau dans une fibre musculaire régule un certain volume cytoplasmique où il se situe.<sup>362</sup> L'élimination de noyaux dans une fibre musculaire par apoptose est

un processus réel qui a été démontré par la technique de TUNEL (Terminal deoxynucleodityl Transferase-mediated dUTP-biotin Nick End Labelling) dans les conditions causant une atrophie musculaire telle que la dystrophie musculaire <sup>363</sup>, la dénervation <sup>364</sup> et l'immobilisation. <sup>365</sup> La diminution du nombre de cellules satellites par apoptose et le déclin de leur potentiel de prolifération pourraient conduire à l'altération de la régénération musculaire. <sup>366;367</sup> Une apoptose accrue a été notée dans les quadriceps de patients ayant une MPOC et possédant un indice de masse corporelle réduit. <sup>368</sup> Par contre, lorsque la population à l'étude possède un indice de masse corporelle normal, aucune augmentation de l'apoptose dans les quadriceps des patients ayant une MPOC n'est observée. <sup>368</sup>

L'inflammation systémique retrouvée chez les sujets ayant une MPOC entraîne un environnement favorable à l'augmentation de la susceptibilité des cellules satellites à l'apoptose. <sup>345</sup> Nous pouvons raisonnablement postuler qu'une augmentation de l'apoptose des cellules satellites contribue à diminuer le nombre de ces cellules pouvant participer à la régénération musculaire. Incidemment, une diminution de la régénération musculaire peut conduire au développement de l'atrophie musculaire chez les patients ayant une MPOC.

#### **1.3.5.5 Sénescence réplivative des cellules satellites**

L'épuisement du potentiel de régénération des cellules satellites est un phénomène pouvant être causé par une utilisation exagérée de ces cellules. Ce phénomène est observé dans les dystrophies musculaires.

Toutes cellules somatiques ont une durée de vie déterminée par la longueur de leurs télomères. <sup>369</sup> Les télomères sont des structures non-codantes retrouvées à l'extrémité des chromosomes servant à la protection contre la dégradation des sections codantes de l'ADN et contre la recombinaison. Il s'agit d'une répétition de TTAGGG d'une longueur variant

entre 10 kpb et 12 kpb dans les cellules musculaires humaines.<sup>370</sup> La portion en 3' de l'ADN ne peut être répliquée à cause du mode de réplication bidirectionnelle des cellules eucaryotes causant une diminution de la longueur des télomères après chaque division<sup>371</sup> et qui résulte en une diminution de la longueur des chromosomes. Le raccourcissement des télomères à une longueur inférieure de 5 à 7 kpb pousse les cellules vers la sénescence réduisant à néant le potentiel de réparation et de croissance des ces cellules.<sup>372</sup> L'épuisement du potentiel de régénération des cellules satellites est la principale explication de la progression fulgurante de la dystrophie musculaire de Duchenne. La fragilité des muscles causée par l'absence d'une protéine structurale, la dystrophine, amplifie les dommages musculaires et ainsi accentue l'activation des cellules satellites. La multiplication exagérée des cellules satellites cause une diminution précoce de la longueur des télomères qui culmine en la sénescence réplivative, diminuant ainsi le nombre de cellules satellites aptes à réparer le tissu musculaire.<sup>373</sup> Il s'agit d'un cas extrême, mais cela démontre que l'épuisement du potentiel de régénération des cellules satellites est un mécanisme qui cause une atrophie musculaire périphérique. D'ailleurs, les athlètes expérimentant de la fatigue induite par l'exercice (Fatigued Athlete Myopatic Syndrome) présentent une diminution significative de la longueur des télomères de leurs cellules musculaires.<sup>374</sup> Ces athlètes ont subi un déclin progressif de leur performance, de leur tolérance à l'entraînement et de la fatigue musculaire excessive qui sont attribuables à une diminution de la régénération musculaire.<sup>375</sup> La diminution de la longueur des télomères cause la sénescence réplivative empêchant des divisions cellulaires subséquentes.

Une diminution de la longueur des télomères des cellules somatiques est un phénomène normal qui est une des causes du vieillissement. Par contre, dans certaines conditions pathologiques, ce phénomène peut se produire de manière accélérée comme dans les muscles des patients atteints d'une dystrophie musculaire. Un vieillissement prématuré du tissu musculaire

et des cellules satellites induit la sénescence répllicative de celles-ci et empêche leur participation à la régénération musculaire. Il est possible que ce phénomène ait cours également chez des personnes ayant une MPOC mais les preuves en ce sens restent à être démontrées.

## **CHAPITRE II**

# **OBJECTIFS ET HYPOTHÈSES DE RECHERCHES**

# Chapitre 2: Objectifs et hypothèses de recherches

## 2.1 Objectifs et hypothèses de recherche

L'atrophie musculaire périphérique est une conséquence importante de la MPOC affectant la qualité de vie et la survie des patients atteints. L'atrophie musculaire dans la MPOC a fait l'objet d'une recherche étendue ce qui a permis de fonder les premières bases des mécanismes généraux impliqués dans l'atrophie musculaire. Cependant, il n'existe toujours pas de thérapie prévenant l'atrophie musculaire dans cette pathologie. Une meilleure compréhension du phénomène est donc nécessaire.

Afin d'acquérir de nouvelles données sur l'atrophie musculaire dans la MPOC, un nouveau modèle d'étude devait être développé. Il existe quelques modèles animaux de maladies pulmonaires, mais aucun ne reproduit les conditions auxquelles les cellules musculaires sont soumises au cours du lent développement de la maladie. Ces conditions peuvent affecter le phénotype de ces cellules qu'elles conserveront par la suite, lorsque cultivées *in vitro*. Le choix a été arrêté sur le développement d'un modèle de culture cellulaire primaire qui permet d'étudier directement les cellules humaines et leurs caractéristiques intrinsèques.

Puisque les cellules satellites sont la principale source de cellules ayant pour rôle le maintien et la réparation du tissu musculaire, il apparaît plausible qu'un dérèglement de la régénération musculaire puisse contribuer au développement de l'atrophie musculaire chez les sujets ayant une MPOC. Il s'agit d'un projet novateur puisque l'hypothèse d'une régénération déficiente causée par une altération au niveau des cellules satellites n'a jamais été étudiée dans ce contexte. De fait, nous voulons vérifier si une altération du potentiel de régénération du tissu musculaire chez des patients



ayant une MPOC pourrait contribuer au développement de l'atrophie musculaire observée chez ceux-ci.

À l'aide de tissu musculaire et du modèle de culture primaire de cellules musculaires, nous voulons comprendre les mécanismes liés au développement de l'atrophie musculaire dans la MPOC. Pour ce faire, les objectifs sont;

1. *Évaluer l'historique répliquative des cellules musculaires du vastus lateralis de patients ayant une MPOC. (Chapitre 3)*
2. *Évaluer la capacité des cellules satellites isolées du vastus lateralis de patients ayant une MPOC à se multiplier et à se différencier. (Chapitre 4)*
3. *Évaluer l'effet d'un entraînement en résistance sur l'activité des cellules satellites et sur l'activité de la myostatine dans le vastus lateralis de patients ayant une MPOC. (Chapitre 5)*
4. *Comparer la capacité de régénération musculaire entre le vastus lateralis et le diaphragme des patients ayant une MPOC. (Chapitre 6)*
5. *Démontrer la présence de facteurs systémiques dans le sérum de patients ayant une MPOC capable d'induire la dégradation des protéines des cellules musculaires. (Chapitre 7)*

## **Objectif 1 : Évaluer l'historique répliquative des cellules musculaires du *vastus lateralis* de patients ayant une MPOC. (Chapitre 3)**

Toutes cellules somatiques ont une durée de vie déterminée par la longueur de leurs télomères, une structure non-codante retrouvée à l'extrémité des chromosomes servant à protéger contre la dégradation et la recombinaison de l'ADN.<sup>370</sup> Dû au mode de réplication semi-conservatif des cellules eucaryotes, il y a une diminution de la longueur des télomères à chaque division puisque la portion en 3' ne peut être répliquée et lorsque trop court, les cellules deviennent sénescents.<sup>376</sup> La sénescence répliquative prématurée est compatible avec l'altération du potentiel de régénération et la dysfonction musculaire du muscle périphérique.<sup>377-379</sup>

**Hypothèse:** Les nombreux cycles de dégénérescence/régénérescence musculaire favorisent la présence de noyaux centraux, réduisant le nombre de cellules satellites et diminuant la longueur des télomères chez les patients atteints d'une MPOC.

**Objectifs :** À partir de tissus musculaires du *vastus lateralis* provenant d'un groupe de patients ayant une MPOC et un groupe de sujets ayant une fonction pulmonaire normale nous voulons :

1. Quantifier le nombre de cellules satellites et de noyaux centraux;
2. Déterminer la longueur des télomères du muscle squelettique.

**Objectif 2 : Évaluer la capacité des cellules satellites isolées du *vastus lateralis* de patients ayant une MPOC à se multiplier et se différencier. (Chapitre 4)**

Les cellules satellites constituent la principale source de cellules responsables du maintien et de la régénération des muscles squelettiques au cours de la vie adulte.<sup>380</sup> Une incapacité à s'activer, à se différencier ou à fusionner aux fibres musculaires sont des événements compatibles avec l'altération du potentiel de régénération des cellules satellites et la dysfonction musculaire.<sup>381-383</sup>

**Hypothèse:** Une prolifération retardée et une différenciation incomplète des cellules satellites provenant des muscles périphériques de patients ayant une MPOC sont responsables d'un processus de régénération inefficace.

**Objectifs :** À partir de tissus musculaires et de cultures primaires du *vastus lateralis* provenant de patients ayant une MPOC et un groupe de sujets ayant une fonction pulmonaire normale nous voulons:

*Dans le tissu musculaire:*

1. Quantifier le nombre de cellules satellites et de noyaux centraux;
2. Mesurer l'expression des facteurs de transcription impliqués dans la myogenèse.

*Dans les cellules satellites isolées:*

3. Mesurer leur potentiel de prolifération et de différenciation;
4. Mesurer l'expression des facteurs de transcription impliqués dans la myogenèse.

### **Objectif 3 : Évaluer l'effet d'un entraînement en résistance sur l'activité des cellules satellites et sur l'activité de la myostatine dans le *vastus lateralis* de patients ayant une MPOC. (Chapitre 5)**

L'atrophie musculaire est un problème prévalent<sup>384</sup> et important<sup>93</sup> chez les patients ayant une MPOC. La littérature démontre que l'exercice en résistance est bien toléré et aide les patients ayant une MPOC à retrouver une meilleure qualité de vie. Par contre, les patients ayant une MPOC ne répondent pas tous aussi bien à l'exercice comparativement à des sujets contrôles.<sup>385</sup> Par ailleurs, une absence de myostatine dans l'organisme mène à une hypertrophie musculaire.<sup>386</sup> À l'inverse, une élévation de son contenu conduit à l'atrophie musculaire.<sup>387</sup> Le niveau d'expression de la myostatine au niveau basal et suite à un exercice en résistance est inconnu chez les patients ayant une MPOC. Cette étude vise à mesurer la réponse des cellules satellites et de la myostatine lors d'un exercice en résistance. Vraisemblablement, la myostatine pourrait jouer un rôle dans l'atténuation de la réponse à l'entraînement chez les malades pulmonaires.

**Hypothèse :** La réponse des cellules satellites suite à un exercice en résistance est différente entre celle des patients atteints d'une MPOC et celles des sujets contrôles. Les cellules satellites isolées des sujets ayant une MPOC sont plus susceptibles aux effets de la myostatine que les cellules provenant des sujets contrôles.

**Objectifs :** En ce sens, nous souhaitons évaluer l'expression de la myostatine et le niveau d'activité des cellules satellites en réponse à une séance d'entraînement en résistance autant chez des sujets ayant une MPOC que chez des sujets contrôles. Nous voulons :

*Dans le tissu musculaire avant et après une séance d'entraînement en résistance:*

1. Quantifier le nombre de cellules satellites et de noyaux centraux;

2. Mesurer l'expression des facteurs de transcription impliqués dans la myogenèse et la signalisation de la myostatine.

*Dans les cellules satellites isolées avant une séance d'entraînement en résistance:*

3. Mesurer le potentiel de prolifération et de différenciation des cellules satellites avec ou sans myostatine;
4. Mesurer l'activité de la voie des SMAD des cellules satellites avec ou sans myostatine.

**Objectif 4 : Comparer la capacité de régénération musculaire entre le *vastus lateralis* et le diaphragme des patients ayant une MPOC. (Chapitre 6)**

Il n'existe aucune donnée sur la capacité de régénération des muscles autre que le *vastus lateralis*, tel que le diaphragme, qui semble affecté différemment par la maladie. Comme au niveau périphérique, la régénération du tissu musculaire pourrait être insuffisante au niveau du diaphragme. Par ailleurs, de récentes études semblent indiquer que l'activation des récepteurs  $\beta$ 2-adrénergiques pourrait jouer un rôle positif sur régénération musculaire et sur la masse musculaire.<sup>388;389</sup> Fait intéressant, les  $\beta$ 2-agonistes sont des médicaments fréquemment utilisés dans le traitement de la MPOC pour leurs propriétés bronchodilatatrices en plus d'avoir un effet positif sur la qualité de vie.<sup>390;391;392</sup> Cette amélioration à long terme de la qualité de vie pourrait en partie être expliquée par son effet sur le tissu musculaire.<sup>393</sup>

**Hypothèses:** Une prolifération retardée et une différenciation incomplète sont responsables d'un processus de régénération inefficace dans les cellules satellites provenant des quadriceps des patients ayant une MPOC. La prolifération et la différenciation des cellules provenant du diaphragme sont préservées contrairement aux cellules provenant du quadriceps. De plus, l'addition de  $\beta$ 2-agonistes sur les cellules musculaires en culture favorise la myogenèse.

**Objectifs :** En ce sens, nous souhaitons évaluer la régénération musculaire des muscles périphériques et respiratoires de patients ayant une MPOC et des sujets contrôles:

*Dans le tissu musculaire:*

1. Quantifier le nombre de cellules satellites et de noyaux centraux;
2. Mesurer l'expression des facteurs de transcription impliqués dans la myogenèse.

*Dans les cellules satellites isolées:*

1. Évaluer le potentiel de prolifération des cellules satellites en présence ou non d'un  $\beta$ 2-agoniste (clenbuterol);
2. Mesurer l'expression des facteurs de transcription impliqués dans la myogenèse en présence ou non d'un  $\beta$ 2-agoniste (clenbuterol).

**Objectif 5 : Démontrer la présence de facteurs systémiques dans le sérum de patients ayant une MPOC capables d'induire la dégradation des protéines des cellules musculaires. (Chapitre 7)**

L'inflammation pulmonaire est responsable de l'initiation et du développement de la MPOC.<sup>395</sup> En fonction du statut de la maladie, la réponse inflammatoire pulmonaire et systémique est présente au repos<sup>50;57;192;396-399</sup> et s'accroît lors de l'exercice ou quand il y a exacerbation de la maladie.<sup>53;400;401</sup> L'expression de l'ARNm de la protéine SAA1 (serum amyloid A1), impliquée dans la réponse inflammatoire<sup>402;403</sup>, est augmentée dans le quadriceps de sujets ayant une MPOC en état stable.<sup>55</sup> Parallèlement, p21, une protéine du cycle cellulaire, pouvant également jouer un rôle dans le contrôle de l'inflammation<sup>404</sup> est aussi augmentée dans le quadriceps des sujets ayant une MPOC.<sup>55</sup> L'écho entre le tissu pulmonaire et le muscle ne peut se faire que par le transit d'éléments pro-inflammatoires dans la circulation systémique. Il est possible que ces éléments puissent rendre l'environnement inadéquat et puissent induire le catabolisme des protéines musculaires.<sup>405</sup>

**Hypothèses:** SAA1 est un facteur présent dans la circulation sanguine des sujets ayant une MPOC. SAA1 induit l'expression des ARNm responsables de la dégradation des protéines musculaires et du cycle cellulaire. p21 est induite dans le *vastus lateralis* des patients ayant une MPOC et atténue l'inflammation induite par SAA1.

**Objectifs :** En ce sens, nous souhaitons circonscrire le rôle joué par les protéines SAA1 et p21 dans les muscles périphériques de patients ayant une MPOC :

*Dans le tissu musculaire:*

- 1) Quantifier au niveau sérique la présence de cytokines inflammatoires (IL-6, IL-8, TNF et SAA1);



- 2) Quantifier en ARNm le niveau d'expression des acteurs impliqués dans la voie de signalisation du IL-6.

*Avec des cellules musculaires en culture :*

- 3) Évaluer l'impact de la SAA1 recombinante sur la dégradation des protéines;
- 4) Évaluer l'impact de l'absence de SAA1 et p21 par siARN avec ou sans stimulus inflammatoire (LPS);
- 5) Évaluer l'impact du plasma des patients ayant une MPOC (stable et en exacerbation) et des sujets contrôles sur la voie de signalisation de l'IL-6 dans des cellules musculaires.

## **CHAPITRE III**

# **SATELLITE CELLS SENESENCE IN LIMB MUSCLE OF SEVERE PATIENTS WITH COPD**

Article publié en 2012 dans le *PLOS ONE*

# **Chapitre 3: Satellite cells senescence in limb muscle of severe patients with COPD**

## **3.1 Mise en contexte et contribution des auteurs**

### Mise en contexte :

L'atrophie musculaire périphérique est un problème fréquent dans la MPOC et affecte négativement les patients atteints. Hormis la sénescence réplivative, plusieurs hypothèses ont été proposées dans la littérature pour tenter d'expliquer cette atrophie. La sénescence réplivative est un phénomène qui peut survenir dans tout tissu ou organe en différenciation terminale composé de cellules somatiques. Ces cellules atteignent la sénescence lorsque les télomères, une structure retrouvée à l'extrémité des chromosomes, deviennent trop courts. Dans le tissu musculaire, une augmentation des dommages, qui requiert une activité élevée des cellules satellites, peut conduire éventuellement à un raccourcissement prématuré des télomères. De fait, dans cette étude nous avons voulu vérifier si le tissu musculaire des sujets ayant une MPOC était plus susceptible aux dommages par la quantification des noyaux centraux et évaluer si ces dommages raccourcissaient prématurément les télomères et induisait la sénescence réplivative.

### Contribution des auteurs :

MET a participé au design de l'étude, effectué les manipulations en laboratoire, amassé les données, analysé tous les résultats et rédigé la version initiale de l'article. MEP, FM et RD ont participé au design de l'étude et ont supervisé le déroulement et l'écriture du manuscrit.

### 3.2 Résumé

**INTRODUCTION:** Le maintien de la masse musculaire en périphérie pourrait être compromis chez les patients ayant une Maladie Pulmonaire Obstructive Chronique (MPOC) par une sénescence répliquative prématurée et l'épuisement du potentiel de régénération.

**MÉTHODES:** Des biopsies du *vastus lateralis* ont été obtenues chez des sujets ayant une MPOC (n=16) et chez des sujets contrôles (n=7). Le nombre de cellules satellites et la proportion des noyaux centraux, un marqueur des événements de régénération, ont été mesurés sur des coupes transversales de muscles. La longueur des télomères, un marqueur de la sénescence répliquative, a été déterminée en utilisant la technique de Southern blot.

**RÉSULTATS:** La proportion de noyaux centraux est significativement augmentée chez les sujets ayant une MPOC avec une masse musculaire préservée comparativement au sujet ayant une MPOC avec atrophie et les sujets contrôles ( $p < 0.001$ ). Chez les sujets ayant une MPOC, la longueur maximale des télomères est significativement réduite comparativement aux sujets contrôles ( $p < 0.05$ ). De plus, la longueur minimale des télomères est significativement réduite chez les sujets ayant une MPOC avec une atrophie comparativement aux sujets contrôles ( $p < 0.005$ ). La longueur minimale, moyenne et maximale des télomères corrèle avec la surface transverse à la mi-cuisse ( $R = 0.523$ ,  $p = 0.005$ ,  $R = 0.435$ ,  $p = 0.019$  et  $R = 0.491$ ,  $p = 0.009$ , respectivement).

**CONCLUSIONS:** Des évidences d'une augmentation des événements de régénération ont été observées dans les muscles des sujets ayant une MPOC avec une masse musculaire préservée. Un raccourcissement des télomères chez les sujets ayant une MPOC avec atrophie est concomitant avec une augmentation du nombre de cellules satellites sénescents et de

l'épuisement du potentiel de régénération compromettant le maintien de la masse musculaire chez ces sujets.

### 3.3 Page titre

#### **Satellite cells senescence in limb muscle of severe patients with COPD**

Marie-Eve Thériault<sup>1</sup>, Marie-Ève Paré<sup>1</sup>, François Maltais<sup>1</sup> and Richard Debigaré<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Centre de recherche de l'Institut universitaire de cardiologie et de pneumologie de Québec, Québec, Canada. \*Corresponding author

**KEYWORDS:** Senescence, atrophy, satellite cells, telomeres, muscle.

**Corresponding Author:** Richard Debigaré, PT, PhD

Centre de recherche, Institut universitaire de  
cardiologie

et de pneumologie de Québec

2725, Chemin Ste-Foy, Quebec City, QC, G1V  
4G5, Canada

Tel. (418) 656-8711 ext 2696

Fax. (418) 656-4509

[Richard.Debigare@rea.ulaval.ca](mailto:Richard.Debigare@rea.ulaval.ca)

### 3.4 Abstract

**RATIONALE:** The maintenance of peripheral muscle mass may be compromised in chronic obstructive pulmonary disease (COPD) due to premature cellular senescence and exhaustion of the regenerative potential of the muscles.

**METHODS:** *Vastus lateralis* biopsies were obtained from patients with COPD (n=16) and controls (n=7). Satellite cell number and the proportion of central nuclei, as a marker of muscle regenerative events, were assessed on cryosections. Telomere lengths, used as a marker of cellular senescence, were determined using Southern blot analyses.

**RESULTS:** Central nuclei proportion was significantly higher in patients with COPD with a preserved muscle mass compared to controls and patients with COPD with muscle atrophy ( $p < 0.001$ ). In COPD, maximal telomere length was significantly decreased compared to controls ( $p < 0.05$ ). Similarly, minimal telomere length was significantly reduced in GOLD III-IV patients with muscle atrophy compared to controls ( $p < 0.005$ ). Minimal, mean and maximum telomere lengths correlated with mid-thigh muscle cross-sectional area (MTCSA) ( $R = 0.523$ ,  $p = 0.005$ ,  $R = 0.435$ ,  $p = 0.019$  and  $R = 0.491$ ,  $p = 0.009$ , respectively).

**CONCLUSIONS:** Evidence of increased regenerative events were seen in GOLD III-IV patients with preserved muscle mass. Shortening of telomeres in GOLD III-IV patients with muscle atrophy is consistent with an increased number of senescent satellite cells and an exhausted muscle regenerative capacity, compromising the maintenance of muscle mass in these individuals.

### 3.5 Introduction

Skeletal muscle atrophy is observed in a variety of acute and chronic conditions [1–5] including chronic obstructive pulmonary disease (COPD) [6]. In COPD, the unintentional loss of muscle mass has a significant impact on quality of life [7] and is associated with premature death [8]. Many biochemical factors have been proposed to initiate and promote the development of skeletal muscle atrophy in COPD [9]. Satellite cell senescence impairing muscle regeneration capacity could be involved in this process [10]. To date, no studies have investigated the prevalence of satellite cell senescence in the context of muscle mass maintenance in COPD.

Satellite cells represent the primary source of myogenic precursor cells contributing to the processes of muscle mass maintenance, hypertrophy and repair after birth [11]. Under their quiescent state, satellite cells are found between the plasmalemma and the basal lamina on the surface of muscle fibre [12]. Upon activation, they proliferate into myoblasts and migrate to the requested site (reviewed by Charge [11]). Newly formed myoblasts will exit the cell cycle, differentiate into myotubes and fuse to an injured myofibre [13]. Newly formed myofibres exhibit a central nucleus and myogenic regulatory factors will subsequently help to migrate the nuclei toward the periphery to form a mature fibre [11]. As such, the proportion of central nuclei has been used as a marker of regenerative events within muscles [14,15]. Senescent satellite cells are unable to enter this process and thus cannot contribute to muscle tissue maintenance [16].

Progressive shortening of satellite cell telomeres plays a significant role in their progression toward senescence thus contributing to premature proliferative arrest and poor tissue renewal. Telomeres are DNA–protein complexes (TTAGGG repeats) located at the ends of every eukaryotic chromosomes, promoting chromosomal and gene expression stability [17]. In the absence of telomerase [18], telomeric length decreases after every division cycle [19] because of the limitation of DNA polymerases in



completing replication of linear DNA strands. Once telomere length reaches ~5 kbp, cells enter an irreversible state of arrested growth and altered function, termed replicative senescence [19]. Even with slight telomerase activity in satellite cells [20], premature telomere shortening has been reported in atrophying models in which excessive number of regenerative events is present [21].

Considering that increased number of senescent satellite cells can directly limit the regenerative potential of muscle tissue, we speculated that the likelihood of finding senescent satellite cell in *vastus lateralis* would be significantly higher in patients with COPD and low muscle mass. To test this hypothesis, satellite cell and central nuclei numbers as well as telomere length in limb muscle specimens were quantified and compared between patients with COPD with or without muscle atrophy and controls.

### **3.6 Materiel and Methods**

#### ***Ethics statement***

The research protocol was approved by the institutional ethics committee (Research ethics committee of the Institut universitaire de cardiologie et de pneumologie de Québec) and a signed informed consent was obtained from each subject.

#### ***Subjects***

Sixteen patients with Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD) stage III and IV COPD and seven patients with normal lung function, all males, were consecutively recruited for this study. Based on a power of 80% and type I error rate of 0.05 to find a significant difference of 3 central nuclei between atrophied and non-atrophied patients, 7 patients per group are needed. COPD diagnosis was based on a past smoking history (> 10 pack-year) and pulmonary function test showing persistent airflow obstruction (forced expiratory volume in 1 s [FEV1] < 50% of predicted value and FEV1/forced vital capacity [FVC] < 70%) [22]. All patients with COPD were in a stable condition at the time of the study and were neither suffering from any other diseases nor using oral corticosteroids or any other medication that could alter satellite cells behaviour. Because low muscle mass is related to poor quality of life [23], reduced functional capacity [7] or survival [8], patients with COPD were subdivided based on the presence of muscle atrophy. In our study, muscle atrophy was defined as mid-thigh cross-sectional area (MTCSA) lower than 70 cm<sup>2</sup>. MTCSA < 70 cm<sup>2</sup> has been previously demonstrated to be associated with decreased survival [8].

#### ***Pulmonary function, anthropometric measurements and body composition***

Standard pulmonary function tests including spirometry, lung volumes, and carbon dioxide diffusion capacity were obtained in all subjects during the

initial evaluation according to previously described guidelines [22]. Results were related to previously published normal values [24]. Height and weight were measured according to standardized methods [25]. Mid-thigh muscle cross-sectional (MTCSA) area was determined using computed tomography, as previously described [8].

### ***Muscle biopsy***

One needle biopsy of the *vastus lateralis*, performed as described by Bergström and routinely done in our laboratory [26] was obtained in each participant. Muscle specimens were frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C for future analysis.

### ***Immunofluorescence***

Muscle section (10 µm) were fixed with ice-cold acetone and methanol 60/40 (v/v) at -20°C for 20 minutes, washed with PBS, incubated with a blocking solution (horse serum 1%) for 1 hour and then incubated with the primary antibody overnight at 4°C in a humidified chamber. The primary antibody Pax7, (R&D Systems, Minneapolis, NE, USA) NCAM (R&D Systems) and laminin (DAKO, Glostrup, Denmark) excesses were cleaned with PBS, incubated with their specific secondary antibodies, a goat anti-mouse Alexa Fluor<sup>®</sup> 488 (R&D Systems) and a goat anti-rabbit Alexa Fluor<sup>®</sup> 546 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) for 1 hour, washed with PBS and then incubated with DAPI for 15 minutes. Slides were analyzed and images were captured using a Nikon Eclipse E600 microscope (Nikon Corporation). Immunofluorescence were performed in duplicate on two distinct muscle cryosections. To ensure maximal image quality, pictures were taken within 24 hours after labelling. All the muscle samples were labelled during the same experimentation.

### ***Satellite cells and myonuclei labeling***

To assess the number of satellite cells in muscle tissue, immunofluorescence was used. Satellite cells have heterogeneous expression of cellular markers resulting in a variety of subsets of cell populations. Thus, it is recommended to use more than one target to fully quantify satellite cells in a given sample [27]. Neural cell adhesion molecules (NCAM) and the transcription factor Pax7, two distinct proteins present in satellite cells, were used to assess the satellite cell number. Immunofluorescence was performed using a standard protocol against NCAM and Pax7 [27]. Laminin was used to delineate muscle fibres. Nuclei were labeled using DAPI. Nuclei located deep to the basal lamina and positive for NCAM or Pax7 were counted as satellite cells. The numbers of satellite cells was counted over 100 myofibres and reported as the number of satellite cells per 100 myofibres.

The presence of central nuclei was interpreted as a regenerative event since myonuclei incorporation is a specific step of muscle repair and satellite cells are responsible for 99% of muscle regeneration [28]. A central nucleus was defined as a committed cell being located inside the perimeter of the fibre delimited by laminin. Number of central nuclei per 100 myofibres is reported.

### ***Fibre typing and cross-sectional area.***

Muscle sections were stained using monoclonal anti-skeletal myosin fast (Sigma, Oakville, ON, Canada) at 4°C with 1:200 dilution and VECTASTAIN Elite ABC system (Vector Laboratories, Burlington, ON, Canada). Peroxydase activity was detected and muscle fibres were classified according to the staining intensity: type I (non-stained) and type II (stained). All fibres were counted with an image analysing system (Image Pro Plus 4.5 for Windows, MediaCybernetics, Silver Spring, MD, USA) and classified to obtain the fibre-type composition for each subject. The mean muscle fibre cross-sectional area (CSA) was determined for each fibre type. The fibre CSA was calculated based on 75 randomly selected fibres for each sample [29].

### ***Genomic DNA extraction and Southern blot analysis***

The intact genomic DNA extraction, digestion and migration were performed as previously described [30]. The intact genomic DNA obtained from muscle tissue was digested for 4 hours at 37°C in the presence of HinfI (0.2 units/μl) (New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts) to generate DNA fragment containing telomere restriction fragments (TRFs). Three micrograms of digested genomic DNA and DNA ladder (1kb and high molecular weight) were resolved by electrophoresis in 0,7% agarose gels that were denatured and neutralized before the transfer on nylon membrane. TRFs were detected by hybridization using a <sup>32</sup>P-TTAGGG probe and visualized by autoradiography. The signal responses were analyzed by Image J.

### ***Telomere length analysis***

The mean telomere length (L) was calculated by integrating the signal intensity above background over entire TRFs distribution as a function of TRFs length using the formula:  $L = \frac{\sum(OD_i \cdot L_i)}{\sum(OD_i)}$  where OD<sub>i</sub> and L<sub>i</sub> are the signal intensity and TRF length respectively at position L on the gel image. To determine the minimum and maximum value of telomere length in a homogenous way for all samples, the densitometric profile of TRF length was integrated over the distance of migration: minimum and maximum telomere length were corresponding to 5% and 95% of this integration, respectively. Minimum, mean and maximum telomere length values were determined for each sample from three independent gels as previously published [31].

Signal analysis generated three distinct measurements that were interpreted as follow: 1) minimal telomere length indicates the size of telomere structures found in dividing cells such as satellite cells. Thus, in satellite cells, shortening in minimal telomere length can be interpreted as their replicative history [32]; 2) mean telomere length represents the size of telomere structures in postmitotic myonuclei which have been incorporated

into muscle fibres from birth to adulthood; 3) maximal telomere length is representative of the size of native telomere length as found in skeletal muscle cells [32]. Of these three measurements, a shorter minimal telomere length in a given sample can be interpreted as a high likelihood of finding a significant number of cells that have exhausted their regenerative potential in this tissue.

### ***Statistical analysis***

Results are expressed as mean ( $\pm$  SEM). All data were normally distributed and statistical test performed accordingly. Differences for all variables between the three groups were analyzed using a one-way analysis of variance (ANOVA) except for telomere length analyses for which one-way analysis of covariance (ANCOVA) was performed to correct for age. Pearson linear regression analysis was performed to test relationship between variables. Subsequent analyses were conducted using this subgroup categorization. Differences were considered to be significant when  $p < 0.05$ .

### **3.7 Results**

#### ***Subject's characteristics***

Anthropometric characteristics and pulmonary function data are provided in Table 1. Patients and controls did not significantly differ regarding age and body mass index. Ten patients had stage III, and the six remaining patients had stage IV disease according to the GOLD classification. As previously published, type I fibre distribution was significantly decreased in patients with COPD. Type II fibre distribution followed the reverse pattern as shown in Table 1. There was a significant decrease in type I fibre CSA in the group of patient with COPD and low muscle mass compared to controls and patients with COPD and preserved muscle mass as shown in Table 1.

#### ***Satellite cell quantification***

A representative *vastus lateralis* cryosections labeled for Pax7 and laminin is depicted in Figure 1A. The number of Pax7+ and NCAM+ satellite cells per 100 fibres did not differ between groups (Figure 1B).

#### ***Central nucleus quantification***

A representative cryosection labeled for nucleus and laminin is provided in Figure 2A. The number of central nuclei averaged per 100 muscle fibres was higher in patients with COPD with preserved muscle mass compared to patients with COPD and low muscle mass and to controls ( $5.64 \pm 2.95$  vs  $2.47 \pm 1.17$  vs  $2.86 \pm 1.58$ , respectively;  $p < 0.05$ ) (figure 2B).

#### ***Telomere length***

Data for minimal, mean and maximal telomere lengths are plotted in Figure 3. Minimal telomere length was significantly shorter in patients with COPD and low muscle mass ( $4479 \pm 88$  Kbp) compared to the other groups (COPD and a preserved muscle mass (MTCSA > 70cm<sup>2</sup>):  $4938 \pm 149$  Kbp and controls:  $5119 \pm 123$  Kbp;  $p < 0.05$ ). The mean telomere length was not

significantly different between patients with COPD ((MTCSA > 70cm<sup>2</sup>): 9052 ± 294 Kbp and (MTCSA < 70cm<sup>2</sup>): 8656 ± 177 Kbp; p>0.05) and controls (9054 ± 244 Kbp) even after analysis considering MTCSA. The maximal telomere length was significantly greater in controls (13846 ± 302 Kbp) compared to patients with COPD ((MTCSA > 70cm<sup>2</sup>): 12811 ± 277 Kbp and (MTCSA < 70cm<sup>2</sup>): 12611 ± 197 Kbp; all p<0.05). Statistically significant correlations were found between minimal (figure 4A), mean (figure 4B) and maximal (figure 4C) telomere length with MTCSA (R=0.523, p=0.005, R=0.435, p=0.019 and R=0.491, p=0.009, respectively).



### **3.8 Discussion**

One of the most striking systemic consequences of COPD is the reduction in peripheral muscle mass resulting in muscle weakness, decreased functional capacity and reduced survival [33,34]. Although several factors such as protein synthesis/degradation imbalance, hypoxia, inactivity, inflammation, and oxidative stress have been proposed to explain the initiation and the progression of muscle wasting in COPD [35], the potential contribution of impaired muscle regeneration has yet to be investigated. This was done in the present study, by evaluating satellite cell number, occurrence of central nuclei and telomere length in peripheral muscle tissue of individuals with or without COPD. One of the major finding of this study is the significant decrease in minimal telomere length observed in patients with COPD and muscle atrophy compared to their COPD counterparts with better preserved muscle mass and controls. This observation is important because it suggests that the likelihood of finding senescent satellite cells is increased in patients with severe COPD and muscle atrophy. Supporting this assumption, presence of shorter telomeres in muscle tissue was correlated with lower MTCSA.

#### ***Satellite cells in COPD***

Regeneration of muscle tissue in a given individual relies on a sufficient number of competent satellite cells. As already shown, the abundance of satellite cells in peripheral muscle of patients with various degree of COPD had been demonstrated to be invariable [36]. In support of this study, this relative preservation in satellite cells number across these three groups as observed in our study suggests that COPD has an insignificant impact on the decline of the satellite cell population.

Despite the similar global satellite cells population in the 3 study groups, the number of central nuclei, a surrogate for the number of satellite cells engaged in a regenerative process, was significantly increased in

patients with COPD and a preserved muscle mass compared to patients with COPD and muscle atrophy and to subjects with normal lung function. These results suggest that an accentuated number of regenerative events are taking place in the muscle tissue of a subset of patients with COPD having a preserved muscle mass. Similar results have been reported in diaphragm of patients with COPD [37]. However, tissue renewal was likely compromised in patients with COPD and muscle atrophy as indicated by a reduced number of central nuclei in these individuals compared to the other group of patient with COPD.

Discrepancies exist in the literature regarding the frequencies of central nuclei in muscle tissue of patient with COPD. Decramer et al. [14] has reported an increased number of central nuclei in steroid-induced myopathy in patients with moderate-to-severe COPD while Gosker et al. [15] did not find any difference between patients with a moderate-to-severe COPD and controls. This disparity could be attributed to the diversity of the population recruited and of the specific mechanisms involved in peripheral muscle dysfunction.

### ***Telomere length and muscle tissue***

Similar to other tissues, replication of satellite cells throughout lifespan is marked by a progressive loss in telomere length defining a finite number of replicative events in which these cells can be engaged for muscle tissue regeneration [21]. For instance, increased number of replicative events following repetitive episodes of muscle injuries is paralleled by a faster telomere shortening in muscle altered by dystrophic conditions. In accordance, decreased telomere length was correlated with lower proliferative capacity in cultured satellite cells from patients with dystrophic muscles [38]. Telomere shortening in COPD has already been reported in alveolar type II epithelial cells [39] and blood leukocytes [40–42]. For the first time, the present report extends this finding to muscle tissue in which shorter

telomere lengths was also found in patients with COPD when compared to controls.

The minimal telomere length shortening seen in patients with COPD and muscle atrophy is coherent with an increased satellite cells proliferation history in this population. In response to tissue damage, satellite cells increase their proliferation and are incorporated to myofibres through a complex and highly regulated myogenic program [11] a process during which the telomere length is shortened. The specific prevalence of limb muscle tissue injury throughout the progression of the COPD is unknown. However, presence of central nuclei was markedly increased in COPD with preserved MTCSA suggesting that, in this subpopulation of patients, the incidence of muscle damages resulting in activation of muscle repair is higher. Eventually, this would lead to the exhaustion of the replicative capacities of the satellite cells as indicated by the reduction in telomere length and to the inability to preserve muscle mass. The significant correlation between minimal telomere length and MTCSA supports this assumption.

Besides an accelerated satellite cell replication, several biochemical events may contribute to telomere shortening [43–45]. Because of its high guanine and cytosine content, a major target of reactive oxygen species, telomeric DNA is more susceptible to oxidative damage [46]. While most studies investigating the effects of oxidative stress on telomere shortening are *in vitro* [47], an *in vivo* link between oxidative stress and the rate of telomere shortening is emerging [48,49]. During exercise, the production of reactive oxygen species, such as superoxide anions, hydrogen peroxide, and hydroxyl radicals is enhanced. Exercise, is thus only be expected, to increase the rate of oxidative damage to DNA and other cellular structures particularly when the capacity of the antioxidant defence mechanisms is exceeded in COPD [50–53]. In COPD, excessive oxidative stress has been reported in lower limb muscles at rest, after exercise and also during disease exacerbation [52–54]. Additionally, the increased level of antioxidant activity observed after exercise

in controls is absent in patients with COPD [50,55]. Thus, it is likely that accentuated oxidative stress, in addition to higher replicative rate history, contributes to the shortening of telomere length in muscle tissue of patients with COPD as reported in the present study.

### ***Methodological considerations***

Despite a relatively modest sample size, a difference in telomere length was observed between groups. The positive correlation between telomere length and MTCSA is also reassuring about the validity of the results. Southern blot was used instead of other techniques such as PCR [41] to determine telomere length. This was done because Southern blot is reliable and has the advantage of providing three distinct length measurements that provide complementary information about the replicative history of the cells. This methodology has also been extensively used in other studies investigating muscle tissue telomere length [21,32]. Although telomere shortening was demonstrated, the mechanisms involved in this phenomenon remain unresolved. Determination of mechanisms and factors related to telomere shortening in patients with COPD was beyond the scope of this study. Because of the study design, analysis of the clinical relationship between functional status and telomere length was not possible. This issue should be addressed in subsequent studies.

### ***Conclusion***

Even if the number of satellite cells was constant throughout the studied groups, the increased number of central nuclei observed is suggestive of an accentuated repair process within the leg muscle of patients with COPD and preserved muscle mass. An increase in damage/repair recurrence may exhaust the regenerative capacity of satellite cells leading to telomere shortening as exemplified by a shorter minimal telomere length in patients with COPD and muscle atrophy. Further studies on the intrinsic capacity of satellite cells to replicate and adopt a myogenic development are

needed. Better understanding of the biological behaviour of satellite cells in COPD will be instrumental in designing pharmacological and exercise training interventions aimed at improving or maintaining muscle mass in this disease.

### **3.9 Acknowledgements**

The authors acknowledge the contribution of Julie Parent for her technical assistance.

### 3.10 References

1. Llovera M, Garcia-Martinez C, Agell N, Lopez-Soriano FJ, Authier FJ et al. (1998) Ubiquitin and proteasome gene expression is increased in skeletal muscle of slim AIDS patients. *Int J Mol Med* 2: 69-73.
2. Tisdale MJ (2002) Cachexia in cancer patients. *Nat Rev Cancer* 2: 862-871.
3. Price SR, Bailey JL, Wang X, Jurkovitz C, England BK et al. (1996) Muscle wasting in insulinopenic rats results from activation of the ATP-dependent, ubiquitin-proteasome proteolytic pathway by a mechanism including gene transcription. *J Clin Invest* 98: 1703-1708.
4. Brooks SV, Faulkner JA (1994) Skeletal muscle weakness in old age: underlying mechanisms. *Med Sci Sports Exerc* 26: 432-439.
5. Tiao G, Fagan JM, Samuels N, James JH, Hudson K et al. (1994) Sepsis stimulates nonlysosomal, energy-dependent proteolysis and increases ubiquitin mRNA levels in rat skeletal muscle. *J Clin Invest* 94: 2255-2264.
6. Debigare R, Marquis K, Cote CH, Tremblay RR, Michaud A et al. (2003) Catabolic/anabolic balance and muscle wasting in patients with COPD. *Chest* 124: 83-89.
7. Gosselink R, Troosters T, Decramer M (1996) Peripheral muscle weakness contributes to exercise limitation in COPD. *Am J Respir Crit Care Med* 153: 976-980.
8. Marquis K, Debigare R, Lacasse Y, LeBlanc P, Jobin J et al. (2002) Midthigh muscle cross-sectional area is a better predictor of mortality than body mass index in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 166: 809-813.

9. Wust RC, Degens H (2007) Factors contributing to muscle wasting and dysfunction in COPD patients. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis* 2: 289-300.
10. Shefer G, Van de Mark DP, Richardson JB, Yablonka-Reuveni Z (2006) Satellite-cell pool size does matter: defining the myogenic potency of aging skeletal muscle. *Dev Biol* 294: 50-66.
11. Charge SB, Rudnicki MA (2004) Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiol Rev* 84: 209-238.
12. Mauro A (1961) Satellite cell of skeletal muscle fibers. *J Biophys Biochem Cytol* 9: 493-495.
13. Snow MH (1978) An autoradiographic study of satellite cell differentiation into regenerating myotubes following transplantation of muscles in young rats. *Cell Tissue Res* 186: 535-540.
14. Decramer M, de Bock V, Dom R (1996) Functional and histologic picture of steroid-induced myopathy in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 153: 1958-1964.
15. Gosker HR, Kubat B, Schaart G, van der Vusse GJ, Wouters EF et al. (2003) Myopathological features in skeletal muscle of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 22: 280-285.
16. Hawke TJ, Garry DJ (2001) Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology. *J Appl Physiol* 91: 534-551.
17. Allsopp RC, Chang E, Kashefi-Aazam M, Rogaev EI, Piatyszek MA et al. (1995) Telomere shortening is associated with cell division in vitro and in vivo. *Exp Cell Res* 220: 194-200.
18. Greider CW (1996) Telomere length regulation. *Annu Rev Biochem* 65: 337-365.



19. Harley CB, Futcher AB, Greider CW (1990) Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* 345: 458-460.
20. O'Connor MS, Carlson ME, Conboy IM (2009) Differentiation rather than aging of muscle stem cells abolishes their telomerase activity. *Biotechnol Prog* .
21. Decary S, Hamida CB, Mouly V, Barbet JP, Hentati F et al. (2000) Shorter telomeres in dystrophic muscle consistent with extensive regeneration in young children. *Neuromuscul Disord* 10: 113-120.
22. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD) (2010) Global Strategy for the Diagnosis, Management and Prevention of COPD.
23. Mostert R, Goris A, Weling-Scheepers C, Wouters EFM, Schols AMW (2000) Tissue depletion and health related quality of life in patients with chronic obstructive pulmonary disease. 94: 859-867.
24. Quanjer PH, Tammeling GJ, Cotes JE, Pedersen OF, Peslin R et al. (1993) Lung volumes and forced ventilatory flows. Report Working Party Standardization of Lung Function Tests, European Community for Steel and Coal. Official Statement of the European Respiratory Society. *Eur Respir J Suppl* 16: 5-40.
25. Heymsfield SB, Matthews D (1994) Body composition: research and clinical advances--1993 A.S.P.E.N. research workshop. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 18: 91-103.
26. Doucet M, Russell AP, Leger B, Debigare R, Joanisse DR et al. (2007) Muscle atrophy and hypertrophy signaling in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 176: 261-269.

27. Lindstrom M, Thornell LE (2009) New multiple labelling method for improved satellite cell identification in human muscle: application to a cohort of power-lifters and sedentary men. *Histochem Cell Biol* .
28. Partridge TA (2002) Cells that participate in regeneration of skeletal muscle. *Gene Ther* 9: 752-753.
29. Blomstrand E, Celsing F, Friden J, Ekblom B (1984) How to calculate human muscle fibre areas in biopsy samples--methodological considerations. *Acta Physiol Scand* 122: 545-551.
30. Allsopp RC, Vaziri H, Patterson C, Goldstein S, Younglai EV et al. (1992) Telomere length predicts replicative capacity of human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 10114-10118.
31. Ponsot E, Kadi F (2008) Signal modelization for improved precision of assessment of minimum and mean telomere lengths. *Electrophoresis* 29: 542-544.
32. Decary S, Mouly V, Hamida CB, Sautet A, Barbet JP et al. (1997) Replicative potential and telomere length in human skeletal muscle: implications for satellite cell-mediated gene therapy. *Hum Gene Ther* 8: 1429-1438.
33. Debigare R, Maltais F (2008) The major limitation to exercise performance in COPD is lower limb muscle dysfunction. *J Appl Physiol* 105: 751-753.
34. Bernard S, LeBlanc P, Whittom F, Carrier G, Jobin J et al. (1998) Peripheral muscle weakness in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 158: 629-634.
35. Kim HC, Mofarrahi M, Hussain SN (2008) Skeletal muscle dysfunction in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis* 3: 637-658.

36. Eliason G, Abdel-Halim S, Arvidsson B, Kadi F, Piehl-Aulin K (2009) Physical performance and muscular characteristics in different stages of COPD. *Scand J Med Sci Sports* 19: 865-870.
37. Orozco-Levi M, Lloreta J, Minguella J, Serrano S, Broquetas JM et al. (2001) Injury of the human diaphragm associated with exertion and chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 164: 1734-1739.
38. Harley CB, Villeponteau B (1995) Telomeres and telomerase in aging and cancer. *Curr Opin Genet Dev* 5: 249-255.
39. Tsuji T, Aoshiba K, Nagai A (2006) Alveolar cell senescence in patients with pulmonary emphysema. *Am J Respir Crit Care Med* 174: 886-893.
40. Savale L, Chaouat A, Bastuji-Garin S, Marcos E, Boyer L et al. (2009) Shortened telomeres in circulating leukocytes of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 179: 566-571.
41. Houben JM, Mercken EM, Ketelslegers HB, Bast A, Wouters EF et al. (2009) Telomere shortening in chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Med* 103: 230-236.
42. Mui TS, Man JM, McElhaney JE, Sandford AJ, Coxson HO et al. (2009) Telomere length and chronic obstructive pulmonary disease: evidence of accelerated aging. *J Am Geriatr Soc* 57: 2372-2374.
43. Lansdorp PM (2005) Major cutbacks at chromosome ends. *Trends Biochem Sci* 30: 388-395.
44. Baird DM (2008) Telomeres II. *Exp Gerontol* 43: 15-19.
45. Hastie ND, Allshire RC (1989) Human telomeres: fusion and interstitial sites. *Trends Genet* 5: 326-331.

46. Saretzki G, von ZT (2002) Replicative aging, telomeres, and oxidative stress. *Ann N Y Acad Sci* 959: 24-29.
47. Richter T, von ZT (2007) A continuous correlation between oxidative stress and telomere shortening in fibroblasts. *Exp Gerontol* 42: 1039-1042.
48. Houben JM, Moonen HJ, van Schooten FJ, Hageman GJ (2008) Telomere length assessment: biomarker of chronic oxidative stress? *Free Radic Biol Med* 44: 235-246.
49. Cattan V, Mercier N, Gardner JP, Regnault V, Labat C et al. (2008) Chronic oxidative stress induces a tissue-specific reduction in telomere length in CAST/Ei mice. *Free Radic Biol Med* 44: 1592-1598.
50. Couillard A, Maltais F, Saey D, Debigare R, Michaud A et al. (2003) Exercise-induced quadriceps oxidative stress and peripheral muscle dysfunction in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 167: 1664-1669.
51. Rahman I, Skwarska E, Macnee W (1997) Attenuation of oxidant/antioxidant imbalance during treatment of exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax* 52: 565-568.
52. Couillard A, Koechlin C, Cristol JP, Varray A, Prefaut C (2002) Evidence of local exercise-induced systemic oxidative stress in chronic obstructive pulmonary disease patients. *Eur Respir J* 20: 1123-1129.
53. van Helvoort HA, Heijdra YF, Thijs HM, Vina J, Wanten GJ et al. (2006) Exercise-induced systemic effects in muscle-wasted patients with COPD. *Med Sci Sports Exerc* 38: 1543-1552.
54. Rahman I, Skwarska E, Macnee W (1997) Attenuation of oxidant/antioxidant imbalance during treatment of exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax* 52: 565-568.

55. Rabinovich RA, Ardite E, Troosters T, Carbo N, Alonso J et al. (2001) Reduced muscle redox capacity after endurance training in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 164: 1114-1118.

### 3.11 Tables

**Table 1 : Subjects characteristics**

	<b>Controls (n=7)</b>	<b>COPD MTCSA &gt; 70cm<sup>2</sup> (n=9)</b>	<b>COPD MTCSA &lt; 70cm<sup>2</sup> (n=7)</b>
<b>Age (years)</b>	67 ± 2.7 <sup>a</sup>	64 ± 2.3 <sup>a</sup>	70 ± 1.7 <sup>a</sup>
<b>BMI (kg /m<sup>2</sup>)</b>	27.2 ± 1.7 <sup>a</sup>	27.2 ± 1.8 <sup>a</sup>	22.3 ± 1.7 <sup>b</sup>
<b>FEV<sub>1</sub>, L</b>	3.1 ± 0.2 <sup>a</sup>	1.0 ± 0.1 <sup>b</sup>	1.0 ± 0.2 <sup>b*</sup>
<b>FEV<sub>1</sub>, % predicted</b>	107.3 ± 3.4 <sup>a</sup>	34.0 ± 2.5 <sup>b</sup>	31.4 ± 5.8 <sup>b*</sup>
<b>FVC, L</b>	3.9 ± 0.3 <sup>a</sup>	2.6 ± 0.2 <sup>b</sup>	2.8 ± 0.2 <sup>b†</sup>
<b>FVC, % predicted</b>	105.6 ± 4.5 <sup>a</sup>	69.0 ± 4.6 <sup>b</sup>	71.7 ± 8.6 <sup>b</sup>
<b>FEV<sub>1</sub> / FVC, %</b>	79.3 ± 1.5 <sup>a</sup>	36.6 ± 1.3 <sup>c</sup>	33.1 ± 3.9 <sup>c*</sup>
<b>DL<sub>co</sub>, (ml CO/min/mmHG)</b>	21.8 ± 2.6 <sup>a</sup>	14.7 ± 1.1 <sup>b</sup>	13.0 ± 0.8 <sup>b†</sup>
<b>MTCSA (cm<sup>2</sup>)</b>	103.5 ± 7.8 <sup>a</sup>	85.5 ± 3.3 <sup>b</sup>	66.4 ± 5.5 <sup>c*</sup>
<b><i>Type I fibre</i></b>			
<b>Distribution, %</b>	57.0 ± 6.6 <sup>a</sup>	32.8 ± 3.6 <sup>b</sup>	28.2 ± 7.9 <sup>b</sup>
<b>CSA, (µm<sup>2</sup>)</b>	5261 ± 360 <sup>a</sup>	4794 ± 364 <sup>a</sup>	4246 ± 314 <sup>b</sup>
<b><i>Type II fibre</i></b>			
<b>Distribution, %</b>	43.0 ± 6.6 <sup>a</sup>	67.2 ± 3.6 <sup>b</sup>	71.8 ± 7.9 <sup>b</sup>
<b>CSA, (µm<sup>2</sup>)</b>	4026 ± 276	3731 ± 203	3677 ± 227

**Definition of abbreviations: BMI = Body mass index; FEV<sub>1</sub> = Forced expiratory volume in 1 second; FVC = Forced vital capacity; DLCO = Diffusing capacity of carbon monoxide; MTCSA = Mid-thigh cross-sectional area; CSA = Cross-sectional area. Values with different lower case letter are significantly different (p<0.05). \* p<0.001; † p<0.01.**

### 3.12 Figure legends

#### Figure 1. Satellite cells quantification.

**A)** *Vastus lateralis* muscle cryosections were labeled for co-expression and localization of nuclear Paired box transcription factor 7 (green), DAPI (blue) and laminin (red). Cells positive for Pax7 or NCAM (not shown) and DAPI located between the plasmalemma and the basal lamina were counted as satellite cells (white arrow). The number of satellite cells is expressed over 100 fibres and reported as a ratio. Ratio are calculated from 9 COPD and MTCSA > 70cm<sup>2</sup>, 7 COPD and MTCSA < 70cm<sup>2</sup> and 7 controls.

**B)** The numbers of nuclei having a positive label for Pax7 (white) and NCAM (black) were counted as satellite cells. Cells positive for Pax7 or NCAM and DAPI located between the plasmalemma and the basal lamina were counted as satellite cells. The number of satellite cells is expressed over 100 fibres and reported as a ratio (ANOVA; p>0.05).

#### Figure 2. Central nucleus quantification.

**A)** Cryosections were analyzed by labeling nuclei (blue) and laminin (red). Immuno-detection is shown for 10µm skeletal muscle cryosections. The number of central nuclei (white arrows) is expressed over 100 fibres and reported as a ratio. Ratio are calculated from 9 COPD and MTCSA > 70cm<sup>2</sup>, 7 COPD and MTCSA < 70cm<sup>2</sup> and 7 controls.

**B)** The total numbers of central nuclei were quantified per 100 fibres for patients with COPD and MTCSA > 70cm<sup>2</sup>, patients with COPD and MTCSA < 70cm<sup>2</sup> and for controls. Nucleus inside the perimeter of a given fibre delimited by laminin was counted as a central nucleus, expressed over 100 fibres and reported as a ratio. Distinct letter represents a statistically significant difference (ANOVA; p<0.05).

#### Figure 3. Telomere length.



**A)** Minimal, **B)** Mean and **C)** Maximal telomere restriction fragment length of the *vastus lateralis* plotted in controls (n=7), patients with COPD and MTCSA > 70cm<sup>2</sup> (n=9) and patients with COPD and MTCSA < 70cm<sup>2</sup> (n=7). The solid horizontal line represents the mean value for the group. Distinct letter represents a statistically significant difference (ANCOVA; p<0.05).

**Figure 4. Minimal, mean and maximum telomere length correlation with MTCSA.**

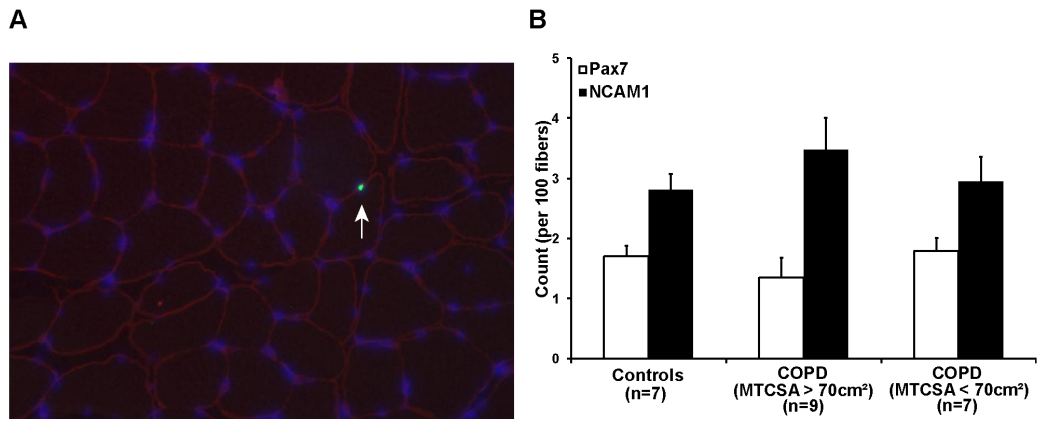
**A)** Relationship between minimal telomere length and Mid-thigh Cross-Sectional Area (MTCSA) in patients with COPD and controls. Telomere length significantly correlated with MTCSA in the studied population (r = 0.523; p = 0.005).

**B)** Relationship between mean telomere length and Mid-thigh Cross-Sectional Area (MTCSA) in patients with COPD and controls. Telomere length significantly correlated with MTCSA in the studied population (r = 0.435; p = 0.019).

**C)** Relationship between maximum telomere length and Mid-thigh Cross-Sectional Area (MTCSA) in patients with COPD and controls. Telomere length significantly correlated with MTCSA in the studied population (r = 0.491; p = 0.009).

### 3.13 Figures

#### Figure 1



#### Figure 2

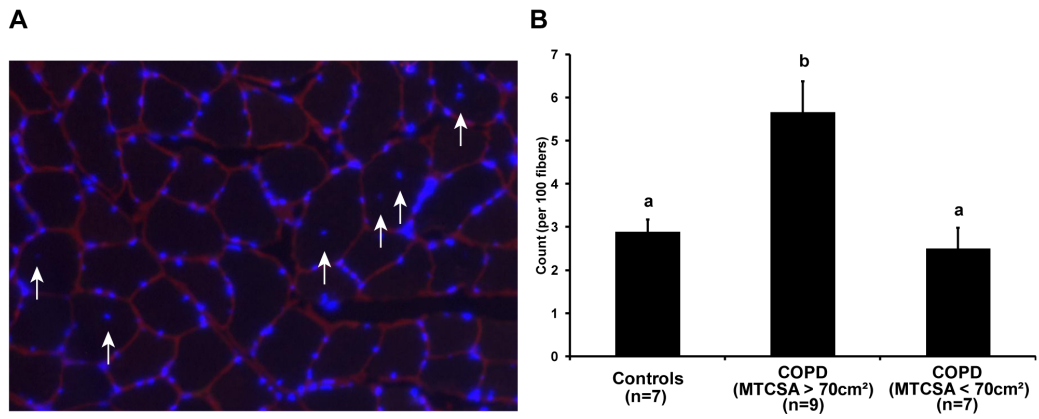


Figure 3

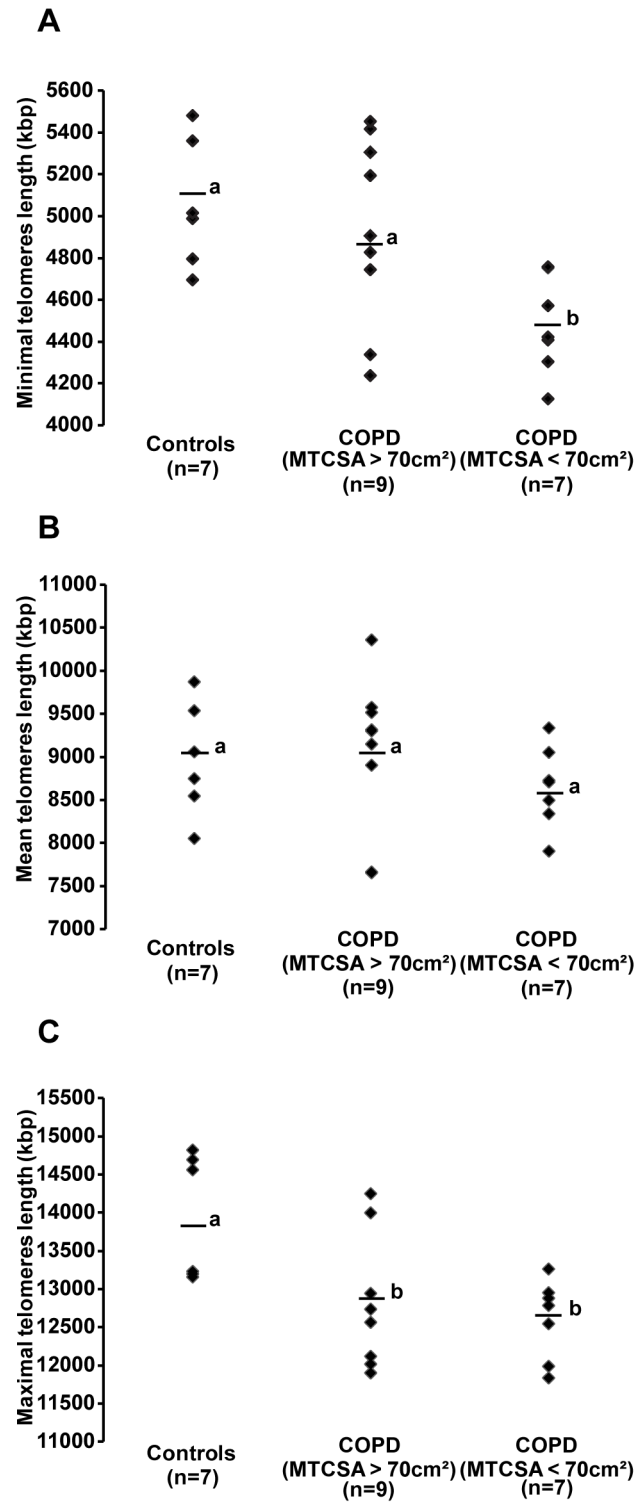
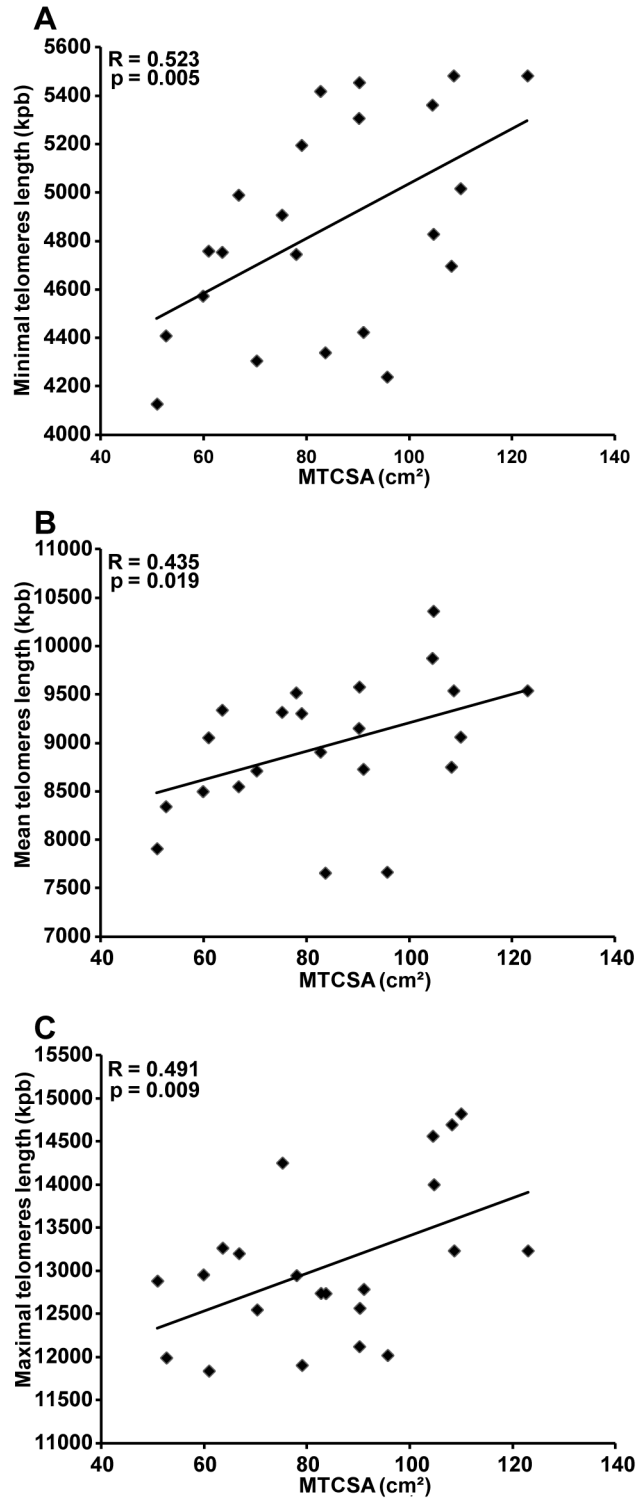


Figure 4



## **CHAPITRE IV**

# **REGENERATIVE DEFECT IN THE *VASTUS* *LATERALIS* OF PATIENTS WITH CHRONIC OBSTRUCTIVE DISEASE**

Article publié en 2014 dans *Respiratory Research*

# Chapitre 4: Regenerative defect in the *vastus lateralis* of patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease

## 4.1 Mise en contexte et contribution des auteurs

### Mise en contexte :

L'atrophie musculaire périphérique est un problème fréquent dans la MPOC et affecte négativement les patients atteints. Les cellules satellites sont les principales cellules responsables de la régénération et du maintien de la masse musculaire au cours de la vie adulte. Une altération au niveau de leur nombre, de leur capacité à s'activer, à proliférer, à se multiplier et à se différencier pourrait diminuer la capacité des muscles à se réparer suite à une blessure. Dans cette étude, nous avons voulu vérifier si les cellules satellites des sujets ayant une MPOC étaient toujours aptes à réparer le tissu endommagé. Des approches *in vivo* et *in vitro* ont été utilisées pour vérifier nos hypothèses.

### Contribution des auteurs :

MET a participé au design de l'étude, effectué les manipulations en laboratoire, amassé les données, analysé tous les résultats et rédigé la version initiale de l'article. BBL a participé au design de l'étude, a amassé des données et supervisé le déroulement et l'écriture du manuscrit. MEP, FM et RD ont participé au design de l'étude et ont supervisé le déroulement et l'écriture du manuscrit.

## 4.2 Résumé

**INTRODUCTION:** Une altération de la régénération musculaire pourrait contribuer à la progression de l'atrophie musculaire chez les patients ayant une MPOC.

**MÉTHODES:** Le nombre de cellules satellites et l'expression des différents facteurs de régulation de la myogenèse ont été comparés entre des sujets contrôles et des sujets ayant une MPOC avec ou sans atrophie.

**RÉSULTATS:** Bien que le nombre de cellules satellites soit similaire entre les groupes, la proportion des fibres avec un noyau central est augmentée chez les patients ayant une MPOC. En regard aux protéines mesurées, une augmentation de l'expression de MyoD et une diminution de l'expression de myogénine et MRF4 ont été observées. *In vitro* une augmentation du contenu en protéine Pax7, Myf5 (prolifération) et myogénine (différenciation) en plus d'une diminution significative du contenu en chaîne lourde de myosine a été démontré chez les sujets ayant une MPOC.

**DISCUSSION:** Dans les cellules satellites provenant des sujets ayant une MPOC, une altération de la prolifération et de la différenciation a été observée. Ces résultats sont compatibles avec une altération de la régénération musculaire pouvant conduire à l'atrophie musculaire dans la MPOC.

### 4.3 Page titre

#### **Regenerative defect in vastus lateralis muscle of patients with chronic obstructive pulmonary disease.**

Marie-Eve Thériault, M.Sc<sup>1</sup>, Marie-Ève Paré, M.Sc<sup>1</sup>, Bruno B. Lemire, PhD<sup>1</sup>, François Maltais, MD<sup>1</sup>, Richard Debigaré, PT, PhD <sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Centre de recherche Institut universitaire de cardiologie et de pneumologie de Québec, Université Laval, G1V 4G5

\*Corresponding author

**Corresponding Author:** Richard Debigaré, PT, PhD  
Tel. (418) 656-8711 ext 2696  
Fax. (418) 656-4509

#### **Email addresses**

MET: [Marie-Eve.Theriault@criucpq.ulaval.ca](mailto:Marie-Eve.Theriault@criucpq.ulaval.ca)

MEP: [Marie-Eve.Pare@criucpq.ulaval.ca](mailto:Marie-Eve.Pare@criucpq.ulaval.ca)

BL: [bruno.x.lemire@gsk.com](mailto:bruno.x.lemire@gsk.com)

FM: [Francois.Maltais@fmed.ulaval.ca](mailto:Francois.Maltais@fmed.ulaval.ca)

RD: [Richard.Debigare@rea.ulaval.ca](mailto:Richard.Debigare@rea.ulaval.ca)



#### **4.4 Abstract**

**BACKGROUND:** Impaired skeletal muscle regeneration could contribute to the progression of muscle atrophy in patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD).

**METHODS:** Satellite cells and myogenesis-related proteins were compared between healthy subjects and patients with COPD, with or without muscle atrophy. Satellite cells were isolated and cultured to assess their proliferative and differentiation aptitudes.

**RESULTS:** Although satellite cell numbers in muscle samples were similar between groups, the proportion of muscle fibers with central nuclei was increased in COPD. In muscle homogenates, increased expression of MyoD and decreased expression of myogenin and MRF4 were observed in COPD. In cultured satellite cells of patients with COPD, increased protein content was observed for Pax7, Myf5 (proliferation phase) and myogenin (differentiation phase) while myosin heavy chain protein content was significantly lower during differentiation.

**CONCLUSION:** In COPD, the number of central nuclei was increased in muscle fibers suggesting a greater number of attempts to regenerate muscle tissue than in healthy subjects. Myogenesis signaling was also altered in muscle homogenates in patients with COPD and there was a profound reduction in the differentiation potential in this population as indicated by a reduced ability to incorporate myosin heavy chain into newly formed myotubes. Collectively, these results indicate that skeletal muscle regenerative capacity termination is impaired in COPD and could contribute to the progression of muscle atrophy progression in this population.

**Keywords:** Satellite cells, COPD, Muscle, Regeneration, Atrophy

## 4.5 Introduction

Skeletal muscle atrophy is observed in a variety of acute and chronic conditions [1-5] including chronic obstructive pulmonary disease (COPD) [6]. In COPD, this loss of muscle mass has a significant impact on quality of life [7] and is associated with premature death [8]. Many biochemical factors have been proposed to initiate and promote the development of skeletal muscle atrophy in COPD [9]. An impaired capacity for muscle regeneration has been hypothesized to take part in this process [10]. However, no studies have yet investigated whether the ability of satellite cells to proliferate and differentiate could be involved in the atrophying process in the context of COPD.

Skeletal muscle possesses a remarkable capacity to regenerate itself, which largely depends on muscle satellite cells and the expression of myogenic regulatory factors (MRFs). Upon activation [11-13], satellite cells proliferate into myoblasts and migrate to the requested site. In the activated state, these cells will enter the cell cycle through the expression of early MRFs such as MyoD and Myf5 [14]. Eventually, newly formed myoblasts will exit the cell cycle and differentiate into myotubes. At this stage cells will express two distinct MRFs, myogenin and MRF4. Fully differentiated myotubes will fuse to injured myofibers for repair or fuse together to form a new one [15]. To preserve an adequate population of muscle satellite cells during adulthood, some newly formed myoblasts will return to a quiescent state [16, 17].

Transition of activated satellite cells to highly proliferative myoblasts and then to differentiated myotubes is a well regulated process. First, up-regulation of Notch signaling promotes the transition of activated satellite cells to highly proliferative myoblasts [18]. A subsequent decline in Notch signaling activity is necessary for differentiation of progenitor cells into fusion competent myoblasts [19]. Increase in the expression of Numb is known to

switch off Notch signaling [18]. The transition from Notch to Wnt signaling in myogenic progenitors is a prerequisite step for differentiation [20].

Muscle is highly dynamic and muscle mass maintenance relies on the delicate balance between protein synthesis and degradation as well as the additions and loss of myonuclei. We hypothesized that the regenerative process is impaired in COPD patients presenting muscle atrophy compared to healthy individuals. This hypothesis is supported by our recent finding that satellite cell senescence is likely occurring in lower limb muscle of patients with COPD and low muscle mass [21]. To further test this hypothesis, the research protocol was divided in two distinct aims: 1) in muscle tissue, to evaluate satellite cell number, by counting the occurrence of central nuclei (a marker of newly fused satellite cells) and to study the expression pattern of myogenesis-related proteins; and 2) in isolated and cultured satellite cells, to assess proliferation, MRFs expression and differentiation as key steps of the regeneration process. This study confirms that although limb muscle of patients with COPD and healthy age matched controls contains the same number of satellite cells, their myogenic capacities are impaired in COPD.

## **4.6 Materiel and Methods**

### **Subjects**

Seventeen males with Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD) stage III and IV disease and nine healthy male subjects with normal lung function were consecutively recruited for this study. None of them were part of a previous study on satellite cell biology in COPD [21]. COPD diagnosis was based on a past smoking history (> 10 pack-year) and pulmonary function tests showing persistent airflow obstruction (forced expiratory volume in 1 s [FEV<sub>1</sub>] < 50% of predicted value and FEV<sub>1</sub>/forced vital capacity [FVC] < 70%) [22]. All patients with COPD were in a stable condition at the time of the study and were neither suffering from any other diseases nor using oral corticosteroids. The institutional ethics committee approved the study protocol and each patient signed a written informed consent form.

### **Study design**

To address aim #1, muscle sections and homogenates of all study participants were used respectively for immunostaining and protein measurements. Eight patients with COPD and seven healthy subjects had sufficient amount of muscle tissue for isolation and culture of satellite cells and fulfilled the second aim of this study.

### **Pulmonary function, anthropometric measurements and body composition**

Standard pulmonary function tests including spirometry, lung volumes, and carbon dioxide diffusion capacity were obtained in all subjects during the initial evaluation according to previously described guidelines [23]. Results were related to previously published normal values [24]. Height and weight were measured according to standardized methods [25]. Mid-thigh muscle

cross-sectional area (MTCSA) was determined using computed tomography, as previously described [8].

### **Muscle biopsy**

One needle biopsy of the vastus lateralis, performed as described by Bergström and routinely done in our laboratory [26], was obtained from each participant. Muscle specimens were divided in two parts. One was frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C for analyses on immunostained muscle sections and on muscle homogenates (aim #1)). When sufficient tissue was available, the second part of the muscle specimen (COPD n=8; controls n=7) was placed in a sterile plate filled with phosphate-buffered saline (PBS), covered and transported on ice under sterile cell culture hood to perform satellite cell isolation (aim #2).

### **Fiber typing**

Muscle sections were stained with a monoclonal anti-myosin (skeletal, fast) antibody (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO, USA) to detect type II muscle fibers using a standard immunohistochemistry protocol. The proportion of type I (nonstained), and II (darkly stained) fibers was assessed and calculated as the number of fibers of each type divided by the total number of muscle fibers on the cryosection.

### **Satellite cells and myonuclei staining**

To assess the number of satellite cells in muscle tissue sections, immunostaining against transcription factor Pax7 (R&D Systems) was performed. Laminin was used to delineate muscle fibers. Nuclei were labeled using DAPI. Nuclei located deep to the basal lamina and positive for Pax7 were counted as satellite cells. Satellite cells were counted in over 100 myofibers and reported as a ratio. Muscle sections (10 µm) were fixed with ice-cold acetone and methanol 60/40 (v/v) at -20°C for 20 minutes, washed with PBS, incubated with a blocking solution (horse serum 1%) for 1 hour and

then incubated with the primary antibody overnight at 4°C in a humidified chamber. The primary antibody Pax7 (R&D Systems) and laminin (Dako, Glostrup, Denmark) excess was cleaned with PBS, incubated with their specific secondary antibodies, a goat anti-mouse Alexa Fluor® 488 (R&D Systems) and a goat anti-rabbit Alexa Fluor® 546 (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA) for 1 hour, washed with PBS and then incubated with DAPI for 15 minutes. Slides were analyzed and images were captured using a Nikon Eclipse E600 microscope (Nikon Corporation, Tokyo, Japan). Immunofluorescences were performed in duplicate on two different muscle cryosections.

### **Satellite cell isolation and culture**

Satellite cells were isolated and cultured as previously published [27]. Briefly, fresh muscle samples were placed in a sterile plate filled with phosphate-buffered saline (PBS), covered and transported on ice under sterile cell culture hood. All subsequent manipulations were performed under sterile conditions. Muscle samples were minced into a slurry using a scalpel and subjected to enzymatic digestion for 1 h with 0,33% collagenase (Cedarlane, Hornby, ON, Canada) at 37°C with gentle agitation. The digested muscle specimens were then dissociated by triturating them several times and filtered through a 100µm filter (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA). Cells were plated and grown on collagen coated dishes (Sigma-Aldrich) in growth medium made of Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) with 1% glucose (HyClone, Logan, UT, USA) supplemented with 20% fetal bovine serum, penicillin 50 U/ml, streptomycin 50 µg/ml (HyClone) and 5ng/ml bFGF (Promega, Madison, WI, USA) in a humidified 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator. The medium was changed every two days and the cultures examined by inverted-phase microscopy. When cultured cells reached a confluence of 70% they were dissociated enzymatically with trypsin (Gibco, Carlsbad, CA, USA) and seeded for immediate propagation, or frozen into medium containing 10% DMSO for later use. To induce differentiation into

myotubes, near to confluence myoblasts were placed in differentiation medium made of DMEM with 1% glucose and supplemented with 2% horse serum (HS), penicillin 50 U/ml, and streptomycin 50 µg/ml (HyClone). Differentiation medium was replaced every day for 7 consecutive days. Images taken from myoblasts and myotubes were captured with a Nikon 950 digital camera (Nikon Corporation). To ensure the exclusivity of the myogenic nature of the cell culture, Pax-7 (R&D Systems, Minneapolis, NE, USA) staining was performed. Immunohistochemistry was performed using Vectastain Elite ABC Kit according to the instructions provided by the manufacturer (Vector Labs, Burlingame, CA, USA).

### **Proliferation assay**

After the first passage, satellite cells were plated at a density of  $5 \times 10^4$  cells in a 60mm cultures dish. Every 24h, cells were trypsinized and counted using a hemacytometer during four successive days.

### **MRFs expression**

To measure progression through myogenesis,  $2 \times 10^5$  cells were placed in a 100 mm dish after their second passage. Cells were allowed 24 hours to settle and adhere before starting the experiment. Near confluent myoblasts were placed in differentiation medium for seven consecutive days. Whole cell lysates were performed every 24 h until complete differentiation for a total of nine days in culture. Western blotting against Pax7 (R&D), MyoD, Myf5, Myogenin, MRF4 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), and Numb (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) was performed to quantify myogenesis related protein accumulation.

### **Differentiation assay**

To measure differentiation rate,  $2 \times 10^5$  cells were placed in a 60 mm dish after their second passage. Near confluent myoblasts were placed in differentiation medium for seven consecutive days. Cell lysates were

prepared every 24 h until seven days of differentiation. To quantify differentiation, western blotting against Myosin Heavy Chain (Sigma-Aldrich) was performed.

### **Statistical analysis**

Results are expressed as mean ( $\pm$  SEM). Data from patients with COPD and healthy controls were analyzed using a one-way analysis of variance (ANOVA). Because low muscle mass is related to poor quality of life [28], reduced functional capacity [7] and survival [8], immunostaining and tissue homogenate data obtained from patients with COPD were subsequently subdivided according to a MTCSA  $<70 \text{ cm}^2$  or  $>70 \text{ cm}^2$  for further sub-analysis purposes. The  $70 \text{ cm}^2$  MTCSA threshold was used to define muscle atrophy based on a previous study showing that mortality was significantly increased in patients with MTCSA below this cutoff value [8]. Differences for all variables between patients with COPD with MTCSA  $<70 \text{ cm}^2$  and  $>70 \text{ cm}^2$  and healthy controls were analyzed using a one-way analysis of variance (ANOVA). Muscle mass was not considered in the analysis of cultured satellite cell data because the composition of the study groups was based on amount of tissue available for cell isolation and not on baseline subject characteristics. Differences were considered to be significant when  $p < 0.05$ .



## 4.7 Results

### Muscle homogenates

#### *Subject's characteristics*

Anthropometric characteristics and pulmonary function data are provided in Table 1. Patients with COPD with MTCSA  $> 70 \text{ cm}^2$  and healthy subjects did not significantly differ in age and body mass index. Patient with COPD and MTCSA  $< 70 \text{ cm}^2$  had a significantly lower body mass index compared to the other two groups. On average, patients with COPD had moderate-to-severe airflow obstruction: eight patients had stage III COPD and nine patients had stage IV disease according to the GOLD classification [29]. Type I fiber proportion was significantly decreased in patients with COPD, while type II fiber proportion was reciprocally increased.

#### *Satellite cells and central nuclei quantification*

A representative vastus lateralis cryosection immunostained for Pax7 (expressed by satellite cells) and laminin (a major constituent of the basal lamina) is depicted in Figure 1A. The proportion of myofibers positive for Pax7 did not significantly differ between groups (Figure 1B).

A representative cryosection immunostained for nucleus and laminin is provided in Figure 2A. The number of central nuclei (a marker of newly fused satellite cells) per 100 muscle fibers was significantly higher in patients with COPD and preserved muscle mass (MTCSA  $> 70 \text{ cm}^2$ ) compared to patients with COPD and muscle atrophy (MTCSA  $< 70 \text{ cm}^2$ ) and healthy subjects ( $7.2 \pm 0.7$  vs  $3.2 \pm 0.2$  vs  $4.0 \pm 0.5$  respectively;  $p < 0.0001$ ) (figure 2B).

#### *Expression of myogenic regulatory factors*

A significant increase in MyoD protein content was observed in patients with COPD with MTCSA  $< 70 \text{ cm}^2$  (Figure 3) compared to healthy subjects (2.31 fold-increase,  $p < 0.05$ ) and to patients with COPD with MTCSA

> 70 cm<sup>2</sup> (1.31 fold-increase, p<0.05). Myf5 protein content was significantly increased in both groups of patients with COPD compared to healthy subjects (1.42 and 1.49 fold-increase respectively, p<0.05). There was a significant decrease in myogenin (0.62 fold-decrease, p<0.005) and MRF4 (0.46 fold-decrease, p<0.005) protein contents in patients with COPD with MTCSA > 70 cm<sup>2</sup> compared to healthy subjects. There was no difference between Pax7 and Numb (total amount) protein content between all three groups.

### **Satellite cell analyses**

To further characterize satellite cells present in the vastus lateralis biopsies, a protocol to isolate and culture muscle satellite cells was developed. Proliferation and differentiation rates of the satellite cells were determined using this model.

#### *Subject's characteristics*

Anthropometric characteristics and pulmonary function data for subjects in whom primary muscle cell culture was performed are provided in Table 2.

#### *Isolation and characterization of satellite cells*

Cultured cells demonstrated myoblast-like and myotubes-like shapes in growing and differentiation states. Positive staining for Pax7 confirmed the satellite cell phenotype of these cells. In all cultures, at least 95% of freshly isolated muscle progenitor cells were classified as Pax7+ satellite cells by immunohistochemistry. Cells were grown under sterile conditions and no signs of any contamination were observed.

When satellite cells were isolated from the muscle samples and put into culture, a delay in their adhesion into dishes was observed. Satellite cells isolated from patients with COPD took  $7.3 \pm 0.3$  days to adhere and

proliferate compared to  $5.5 \pm 0.3$  days ( $p < 0.05$ ) for those isolated from healthy subjects.

### *Proliferation*

Cell proliferation was evaluated by counting growing cells every 24 hours over a 96-hour period. The number of cells at each time point is presented in figure 4. A slight but statistically significant decrease in cell proliferation was observed at 48 hours in patients with COPD compared to healthy subjects ( $p < 0.01$ ). At 72 hour, proliferation rate in COPD was similar compared to healthy subjects with even a significant increase in proliferation at 96 hours in COPD compared to healthy individuals ( $p < 0.005$ ).

### *Myogenesis*

Cells were grown in proliferation medium for two days than placed in differentiation medium for the remaining period of time. In COPD, there was a significant increase in Pax7 accumulation after one day in growing culture medium compared to healthy subjects (2.0 fold-increase,  $p < 0.05$ ) (figure 5A). MyoD protein accumulation during this period was similar between groups while significant increases in Myf5 protein accumulation ( $p < 0.05$ ) were observed in COPD compared to healthy subjects in four distinct days during differentiation (days 4 (3.2 fold-increase), 5 (3.6 fold-increase), 7 (2.9 fold-increase) and 9 (3.5 fold-increase) ( $p < 0.05$ )) (figure 5B and C, respectively). Significant increases in the accumulation of myogenin in patients with COPD compared to healthy subjects were observed at days 0 (2.2 fold-increase) and 1 during proliferation (1.7 fold-increase) ( $p < 0.05$ ) (figure 5D). The accumulation of MRF4 did not differ between groups (figure 5E). Significant decreases in the accumulation of Numb in patients with COPD compared to healthy subjects were observed throughout the proliferation and differentiation periods (figure 5F).

### *Differentiation*

At the end of the myogenic process, the capacity of myoblasts to fully differentiate into myotubes was determined by quantifying the accumulation of MHC over a period of seven days (Figure 6). After three days of differentiation, there was a profound decrease in the accumulation of MHC in COPD compared to healthy subjects that persisted throughout the rest of the differentiation period.

## **4.8 Discussion**

One of the most striking consequences of COPD is the reduction in lower limb muscle mass resulting in loss of muscle strength [30, 31], which has a significant impact on exercise tolerance [32], quality of life [7] and survival [8]. In the present study we sought to determine the contribution of satellite cell activity in the development of limb muscle atrophy in patients with COPD. Our first assessments were performed directly on muscle specimens using histological characterisation and protein content measurements. Even though the number of satellite cells was similar in all groups of subjects tested, indication of increased regenerative events as evidenced by the increased number of central nuclei, was found in patients with COPD and preserved muscle mass compared to patients with COPD and low muscle mass and healthy subjects. Because satellite cells activation, proliferation and differentiation are strongly regulated by the cell environment, we developed primary cell cultures derived from muscle biopsies to further investigate satellite cells intrinsic capacity during proliferation and differentiation. It was found that satellite cells from patients with COPD have a delay in activation that was followed by a significant reduction in MHC accumulation at the end of the myogenic process demonstrating a defect during myotube maturation. Overall, these results are in agreement with a modification of satellite cells intrinsic capacities that could compromise the regenerative potential in lower limb muscles of patients with COPD.

### **Myogenic characteristics of the vastus lateralis**

#### *Satellite cell number*

In order to sustain an appropriate regenerative function and thus be able to support muscle fiber repair, satellite cell population must remain constant during lifespan. In accordance, the density of satellite cells was similar in the three groups of subjects that were investigated. We and others, reported similar results in patients with COPD with or without muscle atrophy

[21] or expressing various levels of lung function impairment [33]. Together, these results demonstrate that satellite cell number is maintained in patients with COPD and suggests that chronic lung disease does not have a significant impact on the rate of decline of the satellite cell population [33].

#### *Central nuclei and regenerative events*

Upon activation, satellite cells multiply and commit their development into myoblasts [12]. The capacity of myoblasts to differentiate into myotubes and form new myofibers is the last critical step for muscle regeneration [12]. The number of central myonuclei is an indication of committed satellite cells into the repair process [15, 34, 35]. Surprisingly we found a higher ratio of central nuclei in patients with COPD without muscle atrophy when compared to patients with COPD and muscle atrophy and healthy subjects, which suggest an increase in the number of regenerative events in this particular group. This observation demonstrates that satellite cells can be activated in this population and also supports the hypothesis that muscle tissue might be more exposed to injury during the progression of the disease [36-38]. On the other hand, in patients with a MTCSA < 70 cm<sup>2</sup>, a decrease in the occurrence of regenerative events compared to patients with COPD and preserved muscle mass is seen, confirming a previous finding by our group [21]. This observation could be interpreted as an exhaustion of the regenerative potential because of satellite cell senescence [21].

#### *MRFs protein levels*

Myogenesis is mainly controlled by four myogenic regulatory factors: MyoD, Myf5, Myogenin and MRF4 which are successively activated upon the initial transcriptional activity of Pax7 by the Notch signaling pathway [39]. MyoD is expressed in muscle satellite cells and mature myofibers [12]. We observed an upregulation of MyoD and Myf5 protein contents in whole muscle extracts from patients with COPD and muscle atrophy suggesting an attempt to accentuate proliferation. These results are in contrast to the study

of Plant et al. who did not find any difference in the level of expression of MyoD in whole muscle protein lysates between patients with COPD and healthy subjects [40]. In the group of patients with COPD and preserved muscle mass, the increased expression of Myf5 (proliferation), which is paralleled by a decrease in the expression of Myogenin and MRF4 (differentiation) suggests that the switch between Notch (proliferation) and Wnt (differentiation) signaling pathway is dysfunctional leading to a sustained proliferative state, a finding that is corroborated by a previous study [41]. Furthermore, the increased number of central nuclei observed in this group is in line with the notion that satellite cells are under a sustained proliferative state.

### **Myogenic process in satellite cells isolated from vastus lateralis**

When sufficient muscle tissue was available, we successfully isolated and cultured satellite cells from patients with COPD and healthy subjects. Phenotype was confirmed by positive staining for both Pax7 and MHC, two specific markers only found in muscle cells ensuring the quality of this model [12, 42]. Moreover, isolated cells had myoblast-like and myotube-like morphologies and expressed specific MRFs during the proliferation and differentiation steps. This protocol allows the culture of satellite cells isolated from fresh human biopsies with high purity and constitutes a powerful tool to assess dynamic events such as proliferation and differentiation. We found that satellite cells isolated from patients with COPD expressed a delayed activation and compromised differentiation when compared with healthy controls cells.

Interestingly, satellite cell adhesion to culture dish was delayed in patients with COPD, suggesting an impaired response to adhesion signals. Cellular proliferation is an essential event for muscle regeneration because the expansion of myogenic cells is needed to provide a sufficient number of new myonuclei for tissue repair [43]. Thus, satellite cell activation must occur within 6 hours post-injury and be followed by robust proliferation within 48

hours to induce an effective muscle regeneration [44, 45]. Although unexplained, the delay in satellite cell adhesion observed in COPD supports the notion that the regenerative process could be altered in this patient population. To further characterize satellite cell activity in the context of COPD, we specifically compared the rate of proliferation of cultured cells isolated from muscle specimens and found that once activated, satellite cells from patients with COPD were able to compensate for their initial delay and produce even more myoblasts after 96 hours in culture than controls.

The proliferation of satellite cells in the context of COPD followed a distinct pattern compared to healthy subjects. Excessive oxidative stress is able to induce a delay in myoblast proliferation [46] and extensive inflammatory response alters differentiation. Because oxidative stress and low grade of systemic inflammation have been reported in COPD [47-49], this ambient milieu could promote dysfunctional proliferation pattern of satellite cells in COPD. Our conditions for cell culture were optimal and withdrawal of inflammatory and/or oxidative stress stigmas might explain the recrudescence in the proliferation rate seen after a few days in the culture dish.

#### *Expression of myogenic regulatory factors during myogenesis*

The basic-helix-loop-helix (bHLH) MRFs Myf5, MyoD, myogenin, and MRF4 act as transcriptional activators of skeletal muscle genes [50]. Myf5 and MyoD act together on a genetic pathway upstream of myogenin and MRF4 to program myogenesis in skeletal muscle cells and it has been suggested that they can counterweigh their own individual actions. For instance, mice lacking functional MyoD gene were found to express about four-fold higher levels of Myf5 leaving them without abnormalities in skeletal muscle development [51]. In our study, during the process of differentiation of satellite cells, we found a three-fold increase in Myf5 content in COPD even if MyoD accumulation was similar between both groups. This observation suggests that MyoD activity might be compromised in satellite cells growing in a distinct environment such as in COPD. Because Myf5 alone is able to



support the appropriate progression of myogenesis as demonstrated by the similar expression of myogenin and MRF4 in both groups in the differentiation phase, we believe that in optimal culture conditions, satellite cells isolated from patients with COPD are able to coordinate their progression toward the formation of myoblasts.

However, the last step of differentiation appears to be affected in COPD. Indeed, the reduced MHC protein accumulation observed in satellite cells from patients with COPD is a strong evidence of an altered differentiation capacity. It can be speculated that the inability of myoblasts to fuse together, a prerequisite step to engage the late MRFs into their transcriptional activity, could explain this finding [52, 53]. Altered transitional signaling in the Notch/Wnt balance is a likely explanation for this observation. The novel finding that impaired Notch signaling may be partly responsible for the loss of myogenic potential in aged muscle is intriguing, and provides a potential clue into the mechanisms underlying this altered regenerative process [35, 54]. Because this study was not designed to specifically address the function of these membrane proteins, further experimentations are warranted to better characterize their role in the regenerative activity of satellite cells isolated from patients with COPD.

### **Limitations of the study**

Because of the nature of the study design, it is difficult to determine causality between impaired regenerative process and muscle atrophy development in COPD. A small number of muscle specimens were used for cell isolation and culture. As a consequence, it was not possible to test the impact of muscle atrophy on satellite cell behaviour when placed into culture. In a similar way, the study was not designed to pursue mechanistic investigations. Even if these limitations are present, this innovative study brings some exciting results that provide foundation for further experimentations aimed at understanding the impact of impaired muscle

regeneration on the atrophying process observed in COPD and other chronic conditions.

## **Conclusion**

We provide strong evidence of a defect in satellite cells biology in the vastus lateralis muscle of patients with COPD. Because cultured satellite cells isolated from muscle samples obtained in patients with COPD have atypical expression pattern of MRFs that may result in poor MHC accumulation in myotubes compared to healthy subjects, we believe that muscle tissue regeneration could be impaired in COPD. The relevance of this finding for the development of muscle atrophy in this disease will need to be considered in future studies. Further efforts to delineate how the in vivo environment (growth factor availability, nature and intensity of the stressors) can affect the intrinsic capacity of satellite cells to regenerate muscle tissue will be useful.

#### **4.9 Acknowledgements**

The authors acknowledge the contribution of Marthe Bélanger, Marie-Josée Breton, Brigitte Jean, Josée Picard for their help in accomplishing this study.

#### 4.10 References

1. Llovera M, Garcia-Martinez C, Agell N, Lopez-Soriano FJ, Authier FJ, Gherardi RK, Argiles JM: Ubiquitin and proteasome gene expression is increased in skeletal muscle of slim AIDS patients. *Int J Mol Med* 1998, 2:69-73.
2. Tisdale MJ: Cachexia in cancer patients. *Nat Rev Cancer* 2002, 2:862-871.
3. Price SR, Bailey JL, Wang X, Jurkovitz C, England BK, Ding X, Phillips LS, Mitch WE: Muscle wasting in insulinopenic rats results from activation of the ATP-dependent, ubiquitin-proteasome proteolytic pathway by a mechanism including gene transcription. *J Clin Invest* 1996, 98:1703-1708.
4. Brooks SV, Faulkner JA: Skeletal muscle weakness in old age: underlying mechanisms. *Med Sci Sports Exerc* 1994, 26:432-439.
5. Tiao G, Fagan JM, Samuels N, James JH, Hudson K, Lieberman M, Fischer JE, Hasselgren PO: Sepsis stimulates nonlysosomal, energy-dependent proteolysis and increases ubiquitin mRNA levels in rat skeletal muscle. *J Clin Invest* 1994, 94:2255-2264.
6. Debigare R, Marquis K, Cote CH, Tremblay RR, Michaud A, LeBlanc P, Maltais F: Catabolic/anabolic balance and muscle wasting in patients with COPD. *Chest* 2003, 124:83-89.
7. Gosselink R, Troosters T, Decramer M: Peripheral muscle weakness contributes to exercise limitation in COPD. *Am J Respir Crit Care Med* 1996, 153:976-980.
8. Marquis K, Debigare R, Lacasse Y, LeBlanc P, Jobin J, Carrier G, Maltais F: Midthigh muscle cross-sectional area is a better predictor of mortality than body mass index in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2002, 166:809-813.

9. Wust RC, Degens H: Factors contributing to muscle wasting and dysfunction in COPD patients. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis* 2007, 2:289-300.
10. Shefer G, Van de Mark DP, Richardson JB, Yablonka-Reuveni Z: Satellite-cell pool size does matter: defining the myogenic potency of aging skeletal muscle. *Dev Biol* 2006, 294:50-66.
11. Tidball JG: Inflammatory processes in muscle injury and repair. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2005, 288:R345-353.
12. Charge SB, Rudnicki MA: Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiol Rev* 2004, 84:209-238.
13. Hawke TJ, Garry DJ: Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology. *J Appl Physiol (1985)* 2001, 91:534-551.
14. Hyatt JP, McCall GE, Kander EM, Zhong H, Roy RR, Huey KA: PAX3/7 expression coincides with MyoD during chronic skeletal muscle overload. *Muscle Nerve* 2008, 38:861-866.
15. Snow MH: An autoradiographic study of satellite cell differentiation into regenerating myotubes following transplantation of muscles in young rats. *Cell Tissue Res* 1978, 186:535-540.
16. Zammit PS, Golding JP, Nagata Y, Hudon V, Partridge TA, Beauchamp JR: Muscle satellite cells adopt divergent fates: a mechanism for self-renewal? *J Cell Biol* 2004, 166:347-357.
17. Collins CA, Partridge TA: Self-renewal of the adult skeletal muscle satellite cell. *Cell Cycle* 2005, 4:1338-1341.
18. Conboy IM, Rando TA: The regulation of Notch signaling controls satellite cell activation and cell fate determination in postnatal myogenesis. *Dev Cell* 2002, 3:397-409.

19. Nofziger D, Miyamoto A, Lyons KM, Weinmaster G: Notch signaling imposes two distinct blocks in the differentiation of C2C12 myoblasts. *Development* 1999, 126:1689-1702.
20. Brack AS, Conboy IM, Conboy MJ, Shen J, Rando TA: A temporal switch from notch to Wnt signaling in muscle stem cells is necessary for normal adult myogenesis. *Cell Stem Cell* 2008, 2:50-59.
21. Theriault ME, Pare ME, Maltais F, Debigare R: Satellite cells senescence in limb muscle of severe patients with COPD. *PLoS One* 2012, 7:e39124.
22. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD). *Global Strategy for the Diagnosis, Management and Prevention of COPD*. Report ed.; 2010.
23. Standards for the diagnosis and care of patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and asthma. This official statement of the American Thoracic Society was adopted by the ATS Board of Directors, November 1986. *Am Rev Respir Dis* 1987, 136:225-244.
24. Quanjer PH, Tammeling GJ, Cotes JE, Pedersen OF, Peslin R, Yernault JC: Lung volumes and forced ventilatory flows. Report Working Party Standardization of Lung Function Tests, European Community for Steel and Coal. Official Statement of the European Respiratory Society. *Eur Respir J Suppl* 1993, 16:5-40.
25. Heymsfield SB WP: Nutritional assessment by clinical and biochemical methods. In: *Modern nutrition in health and disease*. Philadelphia: Lea & Febiger; 1994.
26. Doucet M, Russell AP, Leger B, Debigare R, Joanisse DR, Caron MA, LeBlanc P, Maltais F: Muscle atrophy and hypertrophy signaling in patients

with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2007, 176:261-269.

27. Park YG, Moon JH, Kim J: A comparative study of magnetic-activated cell sorting, cytotoxicity and preplating for the purification of human myoblasts. *Yonsei Med J* 2006, 47:179-183.

28. Mostert R, Goris A, Weling-Scheepers C, Wouters EF, Schols AM: Tissue depletion and health related quality of life in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Med* 2000, 94:859-867.

29. Fabbri LM, Hurd SS: Global Strategy for the Diagnosis, Management and Prevention of COPD: 2003 update. *Eur Respir J* 2003, 22:1-2.

30. Debigare R, Maltais F: The major limitation to exercise performance in COPD is lower limb muscle dysfunction. *J Appl Physiol (1985)* 2008, 105:751-753; discussion 755-757.

31. Bernard S, LeBlanc P, Whittom F, Carrier G, Jobin J, Belleau R, Maltais F: Peripheral muscle weakness in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1998, 158:629-634.

32. Saey D, Debigare R, LeBlanc P, Mador MJ, Cote CH, Jobin J, Maltais F: Contractile leg fatigue after cycle exercise: a factor limiting exercise in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2003, 168:425-430.

33. Eliason G, Abdel-Halim S, Arvidsson B, Kadi F, Piehl-Aulin K: Physical performance and muscular characteristics in different stages of COPD. *Scand J Med Sci Sports* 2009, 19:865-870.

34. Maier A, Gambke B, Pette D: Degeneration-regeneration as a mechanism contributing to the fast to slow conversion of chronically stimulated fast-twitch rabbit muscle. *Cell Tissue Res* 1986, 244:635-643.

35. Conboy IM, Conboy MJ, Wagers AJ, Girma ER, Weissman IL, Rando TA: Rejuvenation of aged progenitor cells by exposure to a young systemic environment. *Nature* 2005, 433:760-764.
36. Moore BJ, Miller MJ, Feldman HA, Reid MB: Diaphragm atrophy and weakness in cortisone-treated rats. *J Appl Physiol* (1985) 1989, 67:2420-2426.
37. Reid WD, MacGowan NA: Respiratory muscle injury in animal models and humans. *Mol Cell Biochem* 1998, 179:63-80.
38. Orozco-Levi M: Structure and function of the respiratory muscles in patients with COPD: impairment or adaptation? *Eur Respir J Suppl* 2003, 46:41s-51s.
39. Wen Y, Bi P, Liu W, Asakura A, Keller C, Kuang S: Constitutive Notch activation upregulates Pax7 and promotes the self-renewal of skeletal muscle satellite cells. *Mol Cell Biol* 2012, 32:2300-2311.
40. Plant PJ, Brooks D, Faughnan M, Bayley T, Bain J, Singer L, Correa J, Pearce D, Binnie M, Batt J: Cellular markers of muscle atrophy in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2010, 42:461-471.
41. Femoselle C, Rabinovich R, Ausin P, Puig-Vilanova E, Coronell C, Sanchez F, Roca J, Gea J, Barreiro E: Does oxidative stress modulate limb muscle atrophy in severe COPD patients? *Eur Respir J* 2012, 40:851-862.
42. Seale P, Sabourin LA, Girgis-Gabardo A, Mansouri A, Gruss P, Rudnicki MA: Pax7 is required for the specification of myogenic satellite cells. *Cell* 2000, 102:777-786.
43. Le Grand F, Rudnicki MA: Skeletal muscle satellite cells and adult myogenesis. *Curr Opin Cell Biol* 2007, 19:628-633.



44. Dreyer HC, Blanco CE, Sattler FR, Schroeder ET, Wiswell RA: Satellite cell numbers in young and older men 24 hours after eccentric exercise. *Muscle Nerve* 2006, 33:242-253.
45. Goetsch SC, Hawke TJ, Gallardo TD, Richardson JA, Garry DJ: Transcriptional profiling and regulation of the extracellular matrix during muscle regeneration. *Physiol Genomics* 2003, 14:261-271.
46. Caporossi D, Ciafre SA, Pittaluga M, Savini I, Farace MG: Cellular responses to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and bleomycin-induced oxidative stress in L6C5 rat myoblasts. *Free Radic Biol Med* 2003, 35:1355-1364.
47. Barnes PJ, Celli BR: Systemic manifestations and comorbidities of COPD. *Eur Respir J* 2009, 33:1165-1185.
48. Crul T, Spruit MA, Gayan-Ramirez G, Quarck R, Gosselink R, Troosters T, Pitta F, Decramer M: Markers of inflammation and disuse in vastus lateralis of chronic obstructive pulmonary disease patients. *Eur J Clin Invest* 2007, 37:897-904.
49. Mitch WE, Price SR: Mechanisms activating proteolysis to cause muscle atrophy in catabolic conditions. *J Ren Nutr* 2003, 13:149-152.
50. Weintraub H, Davis R, Tapscott S, Thayer M, Krause M, Benezra R, Blackwell TK, Turner D, Rupp R, Hollenberg S, et al.: The myoD gene family: nodal point during specification of the muscle cell lineage. *Science* 1991, 251:761-766.
51. Rudnicki MA, Braun T, Hinuma S, Jaenisch R: Inactivation of MyoD in mice leads to up-regulation of the myogenic HLH gene Myf-5 and results in apparently normal muscle development. *Cell* 1992, 71:383-390.
52. Timchenko NA, Iakova P, Cai ZJ, Smith JR, Timchenko LT: Molecular basis for impaired muscle differentiation in myotonic dystrophy. *Mol Cell Biol* 2001, 21:6927-6938.

53. Oexle K, Kohlschutter A: Cause of progression in Duchenne muscular dystrophy: impaired differentiation more probable than replicative aging. *Neuropediatrics* 2001, 32:123-129.

54. Carlson ME, Hsu M, Conboy IM: Imbalance between pSmad3 and Notch induces CDK inhibitors in old muscle stem cells. *Nature* 2008, 454:528-532.

#### 4.11 Tables

**TABLE 1 : Subject Characteristics**

Characteristics	Control	COPD	COPD
	(n= 9)	MTCSA > 70 cm <sup>2</sup> (n= 11)	MTCSA < 70 cm <sup>2</sup> (n= 6)
<b>Age (years)</b>	63 ± 2.3	64 ± 2.3	70 ± 2.4
<b>BMI (kg/m<sup>2</sup>)</b>	29.1 ± 2.4 <sup>a</sup>	28.1 ± 2.0 <sup>a</sup>	21.7 ± 2.6 <sup>b</sup>
<b>FEV<sub>1</sub>, L</b>	3.3 ± 0.2 <sup>a</sup>	1.0 ± 0.2 <sup>b</sup>	0.8 ± 0.1 <sup>b</sup>
<b>FEV<sub>1</sub>, % predicted</b>	106.3 ± 4.1 <sup>a</sup>	36.0 ± 4.9 <sup>b</sup>	26.0 ± 3.8 <sup>b</sup>
<b>FEV<sub>1</sub> / FVC, %</b>	76.0 ± 1.6 <sup>a</sup>	36.1 ± 1.8 <sup>b</sup>	29.0 ± 2.6 <sup>c</sup>
<b>TLC, % predicted</b>	98.6 ± 6.5 <sup>a</sup>	121.6 ± 6.6 <sup>b</sup>	125.7 ± 4.8 <sup>b</sup>
<b>RV, % predicted</b>	90.1 ± 15.3 <sup>a</sup>	173.2 ± 22.8 <sup>b</sup>	195.5 ± 22.9 <sup>b</sup>
<b>DL<sub>CO</sub>, % predicted</b>	96.9 ± 3.2 <sup>a</sup>	57.4 ± 6.7 <sup>b</sup>	40.0 ± 2.8 <sup>c</sup>
<b>MTCSA (cm<sup>2</sup>)</b>	120.3 ± 3.4 <sup>a</sup>	86.3 ± 4.2 <sup>b</sup>	60.8 ± 3.6 <sup>c</sup>
<b><u>Type I fiber</u></b>			
<b>Distribution, %</b>	51.5 ± 5.7 <sup>a</sup>	34.7 ± 9.3 <sup>b</sup>	34.9 ± 3.5 <sup>b</sup>
<b>CSA, (µm<sup>2</sup>)</b>	5170 ± 471	4711 ± 340	4883 ± 607
<b><u>Type II fiber</u></b>			

<b>Distribution, %</b>	44.1 ± 5.7 <sup>a</sup>	65.4 ± 9.3 <sup>b</sup>	65.2 ± 3.5 <sup>b</sup>
<b>CSA, (µm<sup>2</sup>)</b>	4216 ± 358	4359 ± 540	4096 ± 480

---

**Values are means ± SEM**

**Distinct letter represents a statistically significant difference (p < 0.05).**

---

**Definition of abbreviations: BMI = Body mass index; FEV<sub>1</sub> = Forced expiratory volume in 1 second; TLC = total lung capacity; RV = Residual volume; DLCO = Diffusing capacity of carbon monoxide; MTCSA = Mid-thigh cross-sectional area; CSA = Cross-sectional area.**

**Table 2: Subjects characteristics used for primary culture**

<b>Characteristics</b>	<b>Control (n= 7)</b>	<b>COPD (n= 8)</b>
<b>Age</b>	63 ± 2.3	66 ± 2.3
<b>BMI (kg/m<sup>2</sup>)</b>	29.1 ± 2.4	28.8 ± 2.0
<b>FEV<sub>1</sub>, L</b>	3.3 ± 0.2 <sup>a</sup>	1.0 ± 0.1 <sup>b</sup>
<b>FEV<sub>1</sub>, % predicted</b>	106.3 ± 4.1 <sup>a</sup>	37.0 ± 4.0 <sup>b</sup>
<b>FEV<sub>1</sub> / FVC, %</b>	76 ± 1.6 <sup>a</sup>	36.5 ± 1.1 <sup>b</sup>
<b>TLC, % predicted</b>	98.6 ± 6.5	118.0 ± 5.5
<b>RV, % predicted</b>	90.1 ± 15.3 <sup>a</sup>	163.5 ± 15.9 <sup>b</sup>
<b>DL<sub>CO</sub>, % predicted</b>	96.9 ± 3.2 <sup>a</sup>	53.3 ± 5.8 <sup>b</sup>
<b>MTCSA (cm<sup>2</sup>)</b>	120.3 ± 3.4 <sup>a</sup>	82.3 ± 6.5 <sup>b</sup>

**Values are means ± SEM**

**Distinct letter represents a statistically significant difference (p < 0.05).**

**Definition of abbreviations: BMI = Body mass index; FEV<sub>1</sub> = Forced expiratory volume in 1 second; TLC = total lung capacity; RV = Residual volume; DLCO = Diffusing capacity of carbon monoxide; MTCSA = Mid-thigh cross-sectional area.**

#### 4.12 Figure legends

**Figure 1:** (A) *Vastus lateralis* muscle cryosections were immunostained for co-expression and localization of nuclear Paired box transcription factor 7 (green), DAPI (blue) and laminin (red). Labeled nuclei located deep to the basal lamina and positive for Pax7 were counted as satellite cells (white arrow). (B) The number of satellite cells is expressed over 100 fibers and reported as a ratio; ANOVA;  $p > 0.05$ . Ratios are calculated from 9 controls, 11 COPD (MTCSA  $> 70\text{cm}^2$ ) and 6 COPD (MTCSA  $< 70\text{cm}^2$ ).

**Figure 2:** (A) Cryosections were analyzed by immunostaining for nuclei (blue) and laminin (red). Immuno-detection is shown for  $10\mu\text{m}$  skeletal muscle cryosections. Nucleus (white arrows) inside the perimeter of a given fiber delimited by laminin was counted as a central nucleus. (B) The number of central nuclei is expressed over 100 fibers and reported as a ratio. Ratios are calculated from 9 controls, 11 COPD (MTCSA  $> 70\text{cm}^2$ ) and 6 COPD (MTCSA  $< 70\text{cm}^2$ ). Distinct letter represents a statistically significant difference (ANOVA;  $p < 0.05$ ).

**Figure 3:** Western blot against Pax7, MyoD, Myf5, Myogenin, MRF4 and Numb on total protein extract of the muscle biopsies obtained from the *vastus lateralis*. Results are reported as a percentage compared to controls subjects. A distinct letter above graph bars represents a statistically significant difference ( $p < 0.05$ ).

**Figure 4:** Proliferative potential in satellite cells isolated and cultured from controls (white bars) and patients with COPD (black bars). Following the first passage,  $5 \times 10^4$  cells were seeded on a 60mm-dish and were counted every next 24 hours during 96 consecutive hours. Values are expressed as mean  $\pm$  SEM. A distinct letter above graph bars represents a statistically significant difference ( $p < 0.05$ ).

**Figure 5:** A) Pax7 B) MyoD, C) Myf5, D) Myogenin, E) MRF4 and F) Numb protein accumulation during myogenesis in satellite cells isolated and cultured

from controls (white bars; n=7) and patients with COPD (black bars; n=8). Protein extraction was performed daily, the first three days during the myoblasts phase and every other days during the differentiation (day 3 to day 9). Signal analysis was calculated by densitometry and reported over a positive control. A distinct letter between above graph bars represents a statistically significant difference ( $p < 0.05$ ).

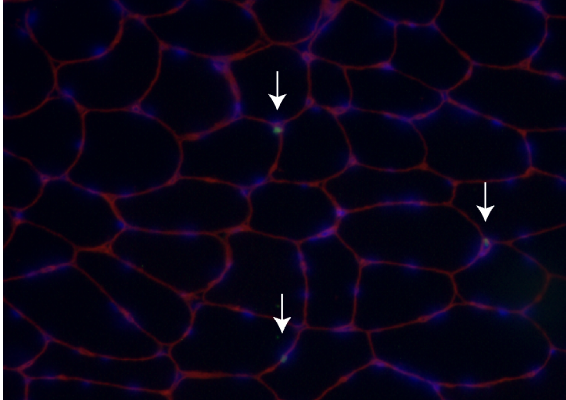
**Figure 6:** Skeletal myosin fast twitch protein accumulation during myogenesis in satellite cells isolated and cultured from controls (white bars; n=9) and patients with COPD (black bars; n=8). Protein extraction was performed daily after initial differentiation. Signal analysis was calculated by densitometry and reported over a positive control. A distinct letter between above graph bars represents a statistically significant difference ( $p < 0.001$ ).

**Figure E1:** Primary myoblasts culture obtained from a needle biopsy of the *vastus lateralis* from a COPD patient after seven days in culture; X 10 magnifications.

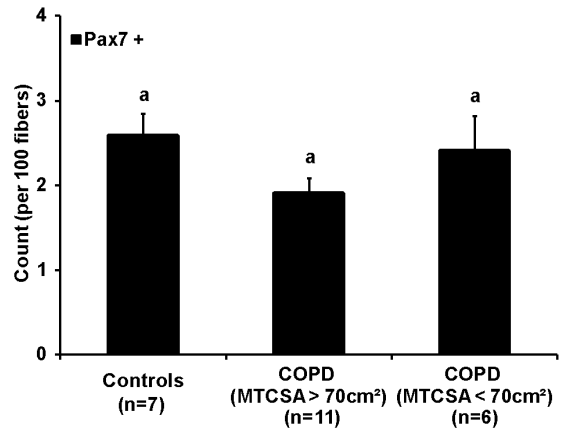
**Figure E2:** Primary myotubes culture obtained from a needle biopsy of the *vastus lateralis* from a COPD patient after seven days in differentiation; X 10 magnifications.

## 4.13 Figures

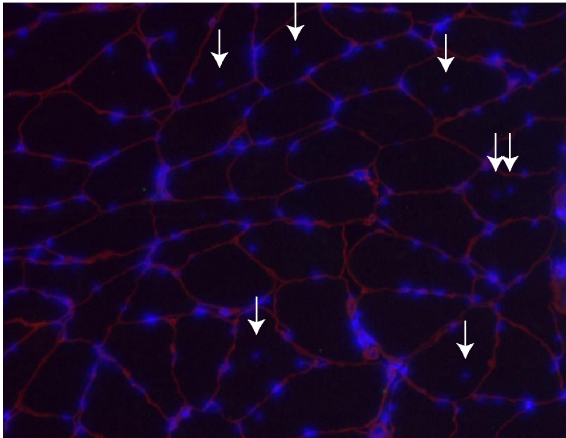
1A



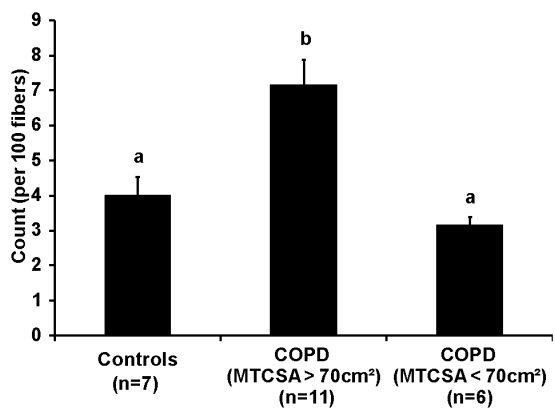
B



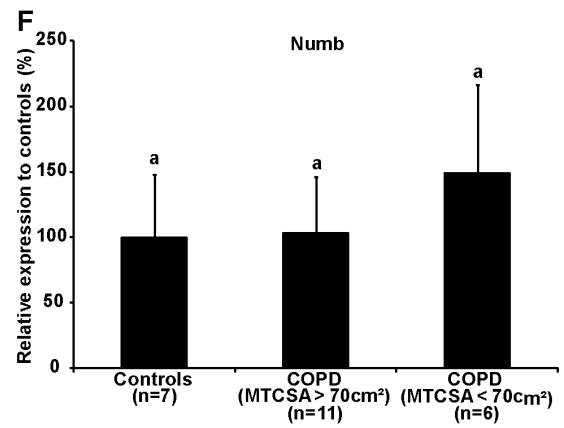
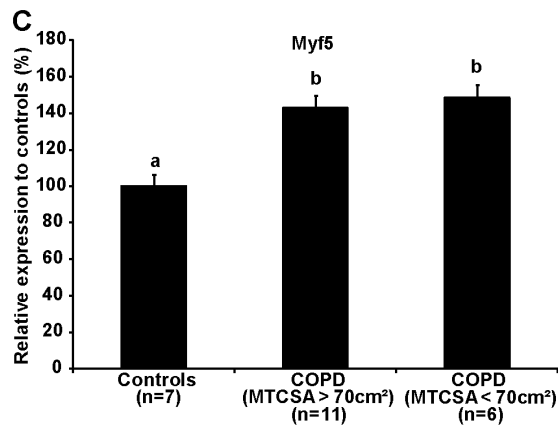
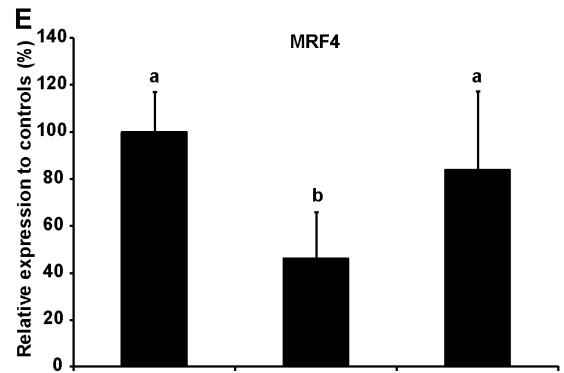
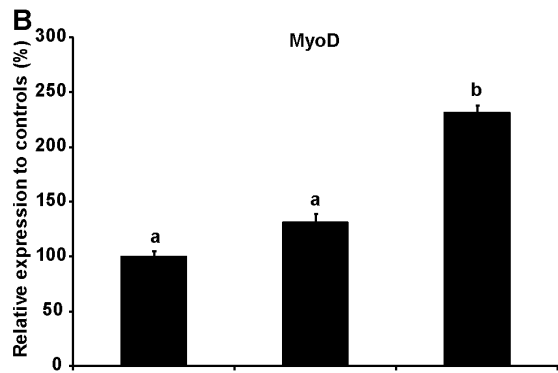
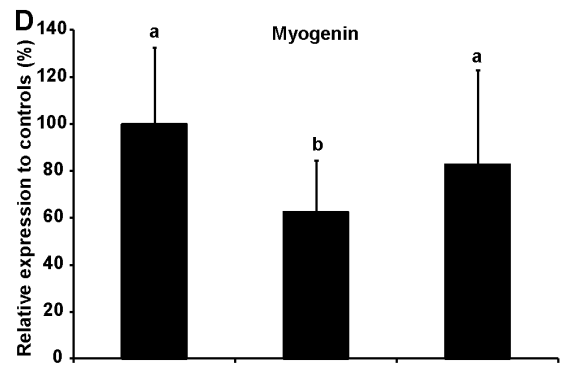
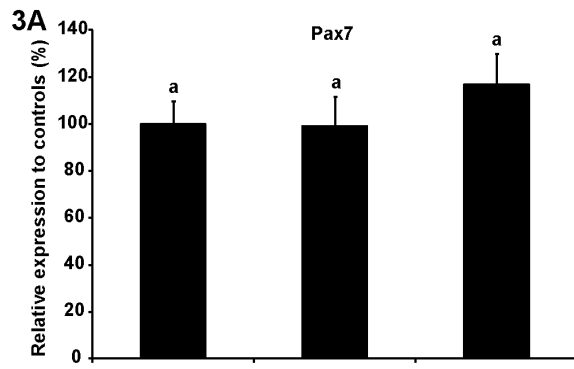
2A

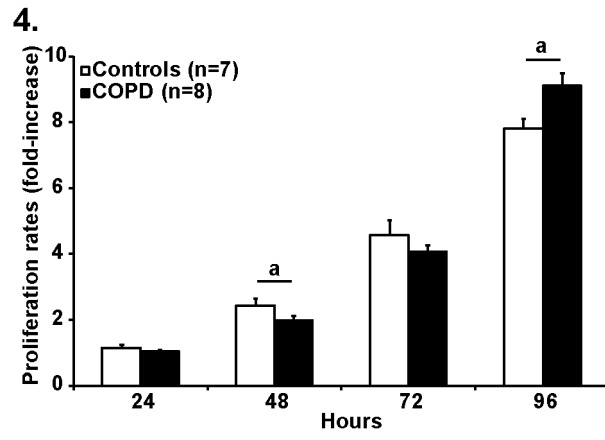


B

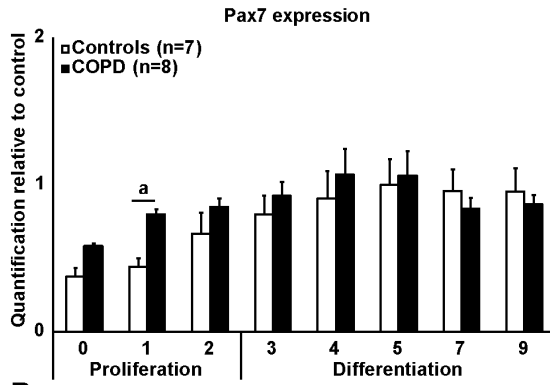




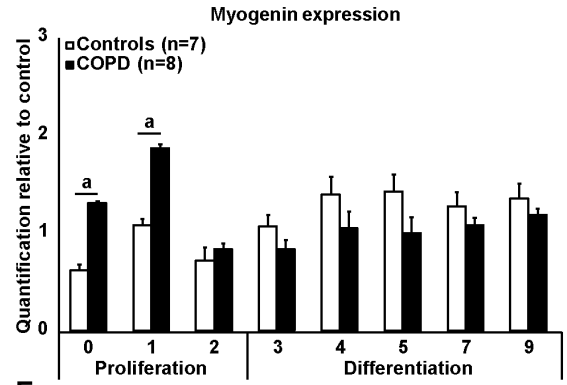




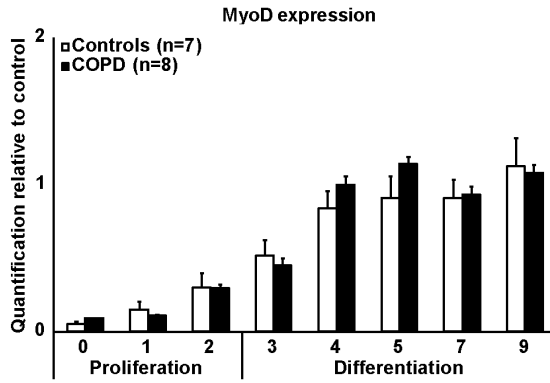
5A



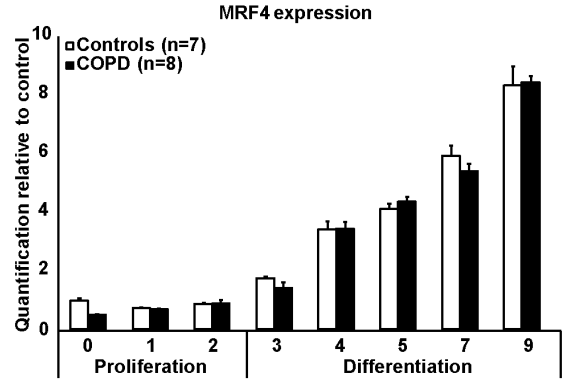
D



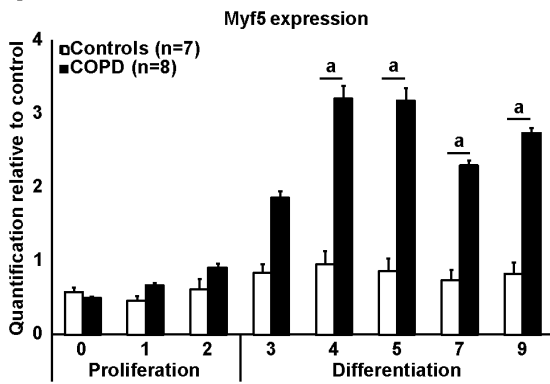
B



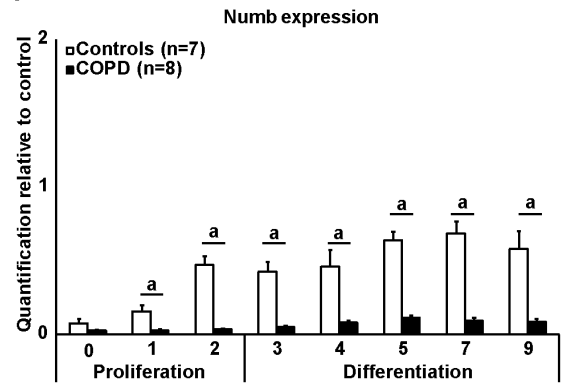
E

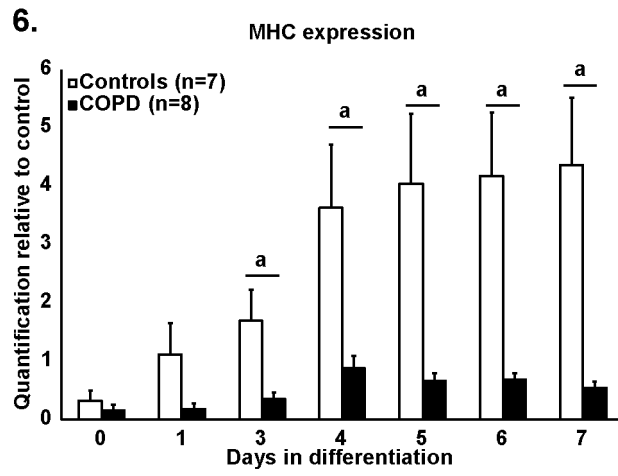


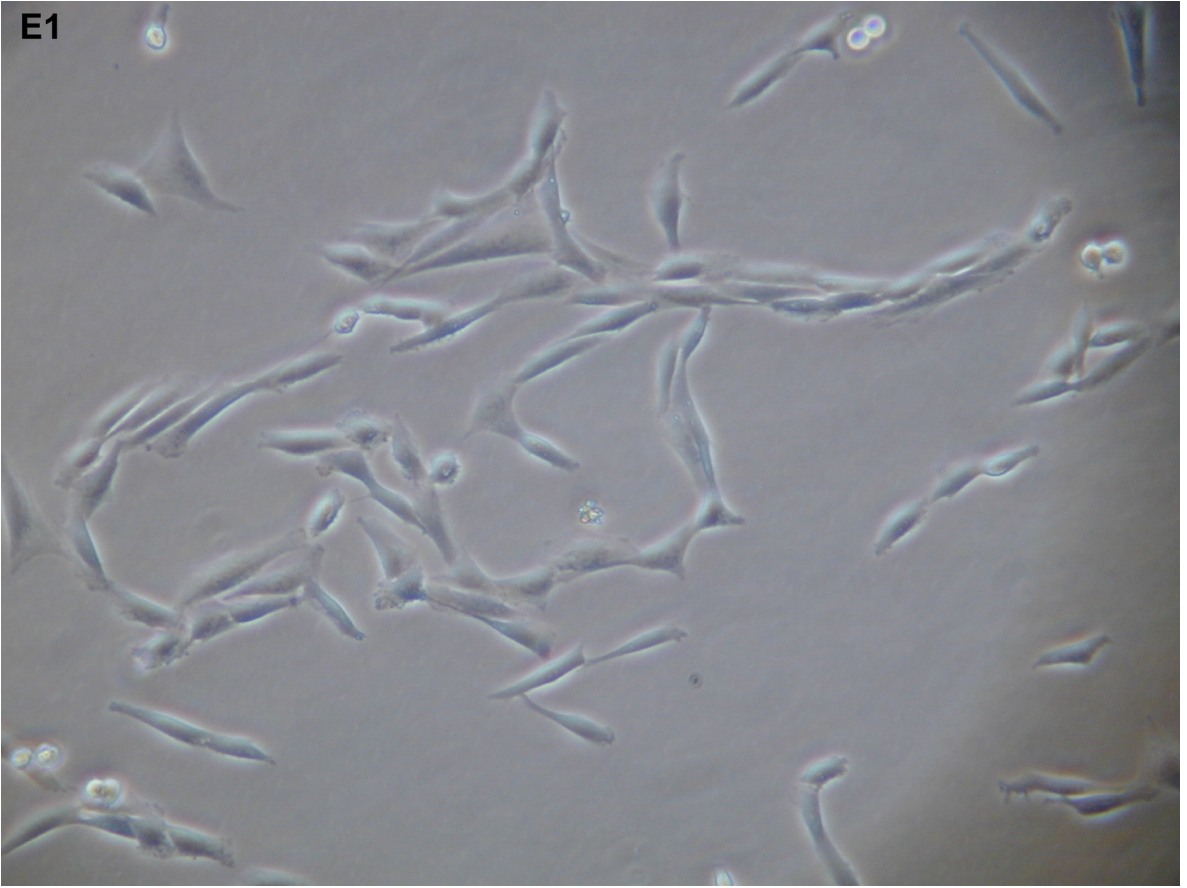
C

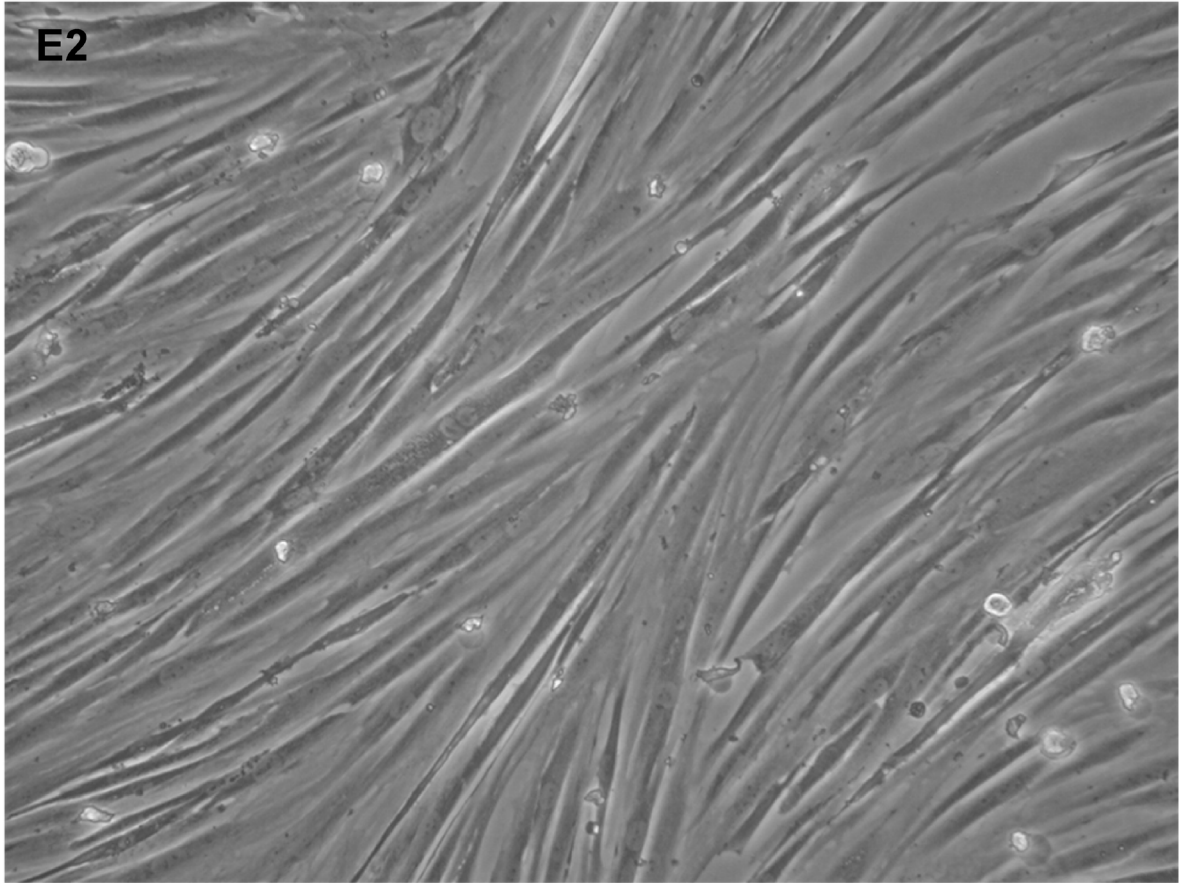


F









## **CHAPITRE V**

# **EFFECT OF AN ACUTE BOUT OF RESISTANCE TRAINING ON SATELLITE CELLS AND MYOSTATIN ACTIVITIES IN PATIENTS WITH COPD**

Article en préparation pour

*The Journal of Applied Physiology*

# Chapitre 5: Effect of an acute bout of resistance training on satellite cells and myostatin activities in patients with COPD

## 5.1 Mise en contexte et contribution des auteurs

### Mise en contexte :

L'atrophie musculaire périphérique est un problème fréquent dans la MPOC et affecte négativement les patients atteints. L'incroyable plasticité du tissu musculaire est en grande partie attribuable aux cellules satellites qui sont responsables de la régénération et du maintien de la masse musculaire au cours de la vie adulte. Dans ce chapitre, nous avons voulu étudier si, en réponse à un entraînement en résistance, les cellules satellites étaient aptes à s'activer, à proliférer et à se différencier normalement. De plus, nous avons voulu étudier si la myostatine, un régulateur négatif de la masse musculaire était responsable de l'atténuation de la réponse à l'entraînement qu'on observe généralement chez les sujets ayant une MPOC suite à un programme de réadaptation. Des approches *in vivo* et *in vitro* ont été utilisées pour vérifier nos hypothèses.

### Contribution des auteurs :

MET a participé au design de l'étude, effectué les manipulations en laboratoire, amassé les données, analysé tous les résultats et rédigé la version initiale de l'article. BBL et FR ont participé au design de l'étude, ont amassé des données et supervisé le déroulement et l'écriture du manuscrit. MEP, FM et RD ont participé au design de l'étude et ont supervisé le déroulement et l'écriture du manuscrit.



## 5.2 Résumé

**INTRODUCTION:** L'entraînement en résistance, tel qu'utilisé en réadaptation pulmonaire, est un outil essentiel afin de promouvoir l'augmentation de la masse et de la force musculaire. Cependant, la réponse à l'entraînement en résistance est hétérogène chez les patients ayant une MPOC. Une altération de la régénération musculaire pourrait contribuer à une réponse à l'exercice atténuée chez les sujets ayant une MPOC.

**MÉTHODES:** Des biopsies du *vastus lateralis* ont été obtenues chez des patients ayant une MPOC (n = 11) et chez des sujets contrôles (n = 10) avant et après une séance d'entraînement en résistance.

**RÉSULTATS:** Avant l'exercice, le nombre de cellules satellites positives pour le facteur Pax7 est similaire entre les groupes. Après l'exercice, le nombre de cellules satellites est significativement augmenté seulement chez les sujets contrôles ( $p < 0.05$ ). Avant l'exercice, la proportion de fibres musculaires avec un noyau central est augmentée chez les sujets ayant une MPOC ( $p < 0.01$ ) tandis que l'entraînement induit une augmentation similaire des noyaux centraux chez tous les sujets. Avant l'exercice, on observe une augmentation du contenu en ARNm des différents facteurs de régulation impliqués dans la myogenèse et une diminution du contenu en ARNm des facteurs impliqués dans la voie de la myostatine chez les sujets ayant une MPOC ( $p < 0.05$ ). Après l'exercice, l'expression de ces différents ARNm est similaire entre les sujets.

**CONCLUSIONS:** Ces résultats indiquent que la régénération musculaire est augmentée au niveau basal et est similaire suite à l'exercice chez les patients ayant une MPOC comparativement à des sujets contrôles. D'autres études seront nécessaires afin de mieux caractériser la réponse des cellules satellites à un programme d'entraînement en résistance afin d'optimiser les interventions lors des programmes de réadaptation pulmonaire.

### 5.3 Page titre

**Effect of an acute bout of resistance training on satellite cell activity in skeletal muscle of patients with chronic obstructive pulmonary disease.**

Marie-Eve Thériault<sup>1</sup>, Bruno B. Lemire<sup>1</sup>, Fernanda Ribeiro<sup>1</sup>, Annie Dubé<sup>1</sup>, Marie-Ève Paré<sup>1</sup>, François Maltais<sup>1</sup>, Richard Debigaré<sup>1\*</sup>

1 Centre de recherche Institut universitaire de cardiologie et de pneumologie de Québec, Université Laval, G1V 4G5

\*Corresponding author

**Running title:** Resistance training on satellite cell activity in COPD

**Corresponding Author:** Richard Debigaré, PT, PhD

Centre de recherche Institut universitaire de  
cardiologie et de pneumologie de Québec.

2725, Chemin Ste-Foy

Quebec City, QC, G1V 4G5

Canada

Tel. (418) 656-8711 ext 2696

Fax. (418) 656-4509

Richard.Debigare@rea.ulaval.ca

#### 5.4 Abstract

**RATIONALE:** Resistance training, as provided in pulmonary rehabilitation, is an essential tool to promote muscle hypertrophy and increase muscle strength. However, hypertrophic response to resistance training is heterogeneous in patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD). It was hypothesized that impaired satellite cell activity or blunted myogenic response to resistance training could contribute to this heterogeneous response.

**METHODS:** Biopsies of the *vastus lateralis* were obtained in patients with COPD (n=11) and controls (n=10) before and after an acute bout of a resistance training session.

**RESULTS:** In muscle biopsies, satellite cell numbers Pax7+ were similar between groups pre-exercise and were significantly increased in controls post-exercise ( $p < 0.05$ ). Pre-exercise, the proportion of muscle fibers with central nuclei was significantly increased in patients with COPD ( $p < 0.01$ ) while similar increase was observed post-exercise in both groups. Pre-exercise, increased mRNA levels of MRF's were found while decreased Myostatin mRNA levels components were found in patients with COPD ( $p < 0.05$ ). After resistance training, mRNA levels of every MRF and myostatin signalling components were similar in both groups.

**CONCLUSIONS:** These results indicate that skeletal muscle regeneration is accentuated pre-exercise and similar post-exercise in patients with COPD compared to controls. Additional studies are needed to better characterize the response of satellite cells following resistance exercise in patients with COPD for optimal intervention on the skeletal muscle in rehabilitation programs.

## 5.5 Introduction

Skeletal muscle atrophy is observed in a variety of acute and chronic conditions (6; 35; 49; 60; 62) including Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD) (17). In COPD, the unintentional loss of muscle mass has a significant impact on quality of life (24) and is associated with premature death (39). Lifelong maintenance of skeletal muscle function depends in large part on preserving the regenerative capacity of muscle fibers, which may be subjected to a variety of physical and biochemical insults that introduce substantial muscle damages. Repair of injured fibers requires a unique population of tissue-specific muscle stem cells called satellite cells (41). Myostatin, a member of the Transforming Growth Factors beta (TGF- $\beta$ ) superfamily has been shown to inhibit satellite cells activity and to be downregulated after exercise to promote muscle regeneration (30). Failure in satellite cell function can lead to delayed, impaired or failed recovery after muscle injury, and such failures become increasingly prominent in cases of progressive muscle disease. To date, no studies have investigated the response of satellite cells and myostatin signalling pathway after resistance training exercise in patients with COPD.

Exercise training, particularly resistance training, has been shown effective in counteracting the deleterious effects of inactivity-induced skeletal muscle atrophy (2). Resistance training has a relatively low ventilatory burden (50) and may therefore be the preferred form of skeletal muscle loading for patients with COPD. Although an intervention of choice, response to resistance training is heterogeneous in patients with COPD. For instance, the improvements in muscle strength in patients with COPD participating in an 8-weeks rehabilitation program show gains that reached 70% of controls baseline values (22). In a 10-weeks study in which resistance training was combined with testosterone injections, exercising patients with COPD receiving placebo slightly gained lean mass compared to patients using steroids alone or in combination with exercise (9).

Because resistance training induces myofibrillar damages, tissue repair mechanisms are essential. Satellite cells represent the primary source of myogenic precursor cells contributing to the processes of maintenance, hypertrophy and repair of muscle tissue after birth. Under quiescent state, they are found on the surface of muscle fiber between the plasmalemma and the basal lamina (41). Following a proper stimulus, activation of satellite cells will result in the upregulation of Pax7, which will lead to the cell cycle entry by the expression of myogenic regulatory factors (MRF) such as MyoD and Myf5 (26). Eventually, newly formed myoblasts will exit the cell cycle in order to differentiate into myotubes. At this stage they will express two other MRFs, myogenin and MRF4, essential for the migration of the central nuclei between the plasmalemma and the basal lamina to form mature fiber. Thus, newly form myofiber will exhibit a central nuclei (10). Fully differentiate myotubes will fuse to injured myofibers for repair or fuse together to form a new one (56). In order to preserve an adequate population of muscle satellite cells during adulthood, some newly formed myoblasts will return to the quiescent state (11; 67).

Satellite cells respond to exogenous factors such as myostatin, a potent negative factor involved in the muscle mass balance (32). Myostatin exerts its activity through the activin receptor type IIB (ActRIIB) on skeletal muscle. Following tetramerization of the receptor complex, the signal is relayed into the cytoplasm by the SMAD signalling. Both protein phosphorylation of SMAD 2 and 3 allow binding to SMAD4. This complex then translocate into the nucleus to regulate the expression of targeted genes (31; 32; 40). Follistatin is a potent antagonist of myostatin that takes advantage of its ability to hinder access to signalling receptors on skeletal muscle. The myostatin expression is regulated by many factors as demonstrated by the presence of E-boxes (MyoD binding sites), MEF2 binding sites, GREs and androgen response elements (ARE), suggesting that its activity is required to control important myogenic events such as myoblast differentiation and proliferation (13; 36; 54; 57).

Hypertrophic adaptations to resistance training occurring at the cellular level are most likely the result of cumulative effects of transient changes in gene expression after each bout of exercise. Resistance exercise has been shown to upregulate the expression of various genes in skeletal muscle, such as myosin heavy chain (MHC) isoforms and MRFs (64), which can invariably induce muscle protein synthesis and result in hypertrophy. On the other hand, myostatin-mediated muscle wasting results in a reduction in the expression of key myogenic regulatory factors, including MyoD and myogenin (20; 42) and in the expression of several myogenic structural genes, including myosin heavy chain (MHC) and desmin. Because resistance exercise and myostatin can exert their effect on the same target, we asked the question as whether myostatin could be the reason why some patients show little to no improvement following a rehabilitation program.

The purpose of this investigation was fourfold: (a) to measure in muscle biopsies the number of satellite cells and the occurrence of central nuclei (b) to examine if baseline differences in the expression of myogenic-related genes and myostatin-related genes exist between patients with COPD and controls (c) to examine the effects of an acute bout of resistance exercise on the expression of myostatin-related and myogenesis-related genes and (d) to characterize satellite cell activity using primary muscle cell culture (*in vitro*) in presence or in the absence of recombinant myostatin. Considering previously published work, it was hypothesized that the expression of myostatin pathway and the response of satellite cells to myostatin would be upregulated in patients with COPD compared to controls. Following acute resistance exercise, the expression of myogenesis related genes would be upregulated to a lesser extent in patients with COPD.

## **5.6 Materiel and Methods**

### ***Subjects***

Eleven males with Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD) stage III and IV disease and ten subjects with normal lung function were consecutively recruited for this study. COPD diagnosis was based on a past smoking history (> 10 pack-year) and pulmonary function test showing persistent airflow obstruction (forced expiratory volume in 1 s [FEV1] < 50% of predicted value and FEV1/forced vital capacity [FVC] < 70%) (23). All patients with COPD were in a stable condition at the time of the study and were neither suffering from any other diseases nor using oral corticosteroids or any other medication that could alter satellite cells behaviour. The institutional ethics committee approved the study protocol and all recruited subjects signed a written informed consent form.

### ***Study design***

Anthropometric measurements, pulmonary function testing, mid-thigh cross-sectional area by computed tomography (CT scan), exercise familiarization and testing were performed. Subjects then returned to the laboratory for a *vastus lateralis* biopsies and blood sampling at rest. Three days later (72 hours), the participants came back to the laboratory for the acute resistance exercise bout, the post-exercise muscle biopsy and blood sample.

### ***Pulmonary function testing***

Standard pulmonary function tests including spirometry, lung volumes, and carbon monoxide diffusion capacity were obtained in all subjects during the initial evaluation according to previously described guidelines (1). Results were related to previously published normal values (51).

### ***Muscle biopsy***

One needle biopsy of the *vastus lateralis*, performed as described by Bergström and routinely done in our laboratory (19) was obtained in each participant. Muscle specimens were divided in two parts. The first part was frozen in liquid nitrogen and stored at - 80°C for future analysis. When sufficient tissue was available, the second part was used for satellite cell isolation and culture. In resting condition, the pre-exercise muscle biopsy was done three days prior the exercise session in order for the quadriceps to heal properly and not compromise the exercise session and to avoid the unnecessary measurements of the inflammatory surge post-biopsy in the muscle tissue.

### ***Blood sampling and analysis***

The antecubital venous blood was centrifuged for 15 minutes, plasma was aliquoted, and stored at -80°C until further analysis. Commercial ELISA kits (R&D Systems Inc, Minneapolis, MN, USA) were used to measure the plasma levels of systemic inflammatory markers (IL-6, IL-8 TNF).

### ***Resistance training session***

The exercise session consisted of three resistance exercises that primarily focused on lower limbs. Two sets of 10-12 repetitions of dumbbell squat, leg press and leg extension were performed at 75 to 80% 1RM in a controlled manner to look like a typical training program. Participants were allowed a one-minute break between sets.

### ***Satellite cells and myonuclei staining***

To assess the number of satellite cells, immunostaining against the transcription factor Pax7 (R&D) was performed on 10 µm muscle tissue sections. Immunofluorescence was accomplished using a standard protocol as previously published (33; 59). Laminin was used to delineate muscle fibers. Nuclei were labeled using DAPI. Nuclei located deep to the basal



lamina and positive for Pax7 were counted as satellite cells. The numbers of satellite cells was reported over 100 myofibres and stated as a ratio.

Presence of central nuclei was interpreted as a regenerative event since myonuclei incorporation is a specific step of muscle repair and satellite cells are responsible for 99% of muscle regeneration (47). A central nucleus was defined as a committed satellite cell being located inside the perimeter of the fiber delimited by laminin. Number of central nuclei per 100 myofibres is reported.

### ***Real-Time PCR***

Total RNA extraction was performed from 15 mg of muscle using a commercially available preparation (TRIzol<sup>®</sup> Reagent, Invitrogen, Burlington, Ontario, Canada). One µg of RNA was reverse transcribed to cDNA using Quantitect<sup>™</sup> Reverse Transcription Kit (Qiagen, Mississauga, Ontario, Canada). Real time PCR were performed in a Rotor-Gene<sup>™</sup> 6000 (Corbett Life Science, San Francisco, CA, USA) using Quantitect<sup>™</sup> SYBR<sup>®</sup> Green PCR Kit (Qiagen, Mississauga, Ontario, Canada). The comparative threshold cycles ( $\Delta$ CT) values for Akt, Atrogin1, Myostatin, MyoD, Pax7, cMet, Myf5, Myogenin, MRF4, Notch1, Wnt, Numb, Act11RB, SMAD2, SMAD3, SMAD4, Follistatin, TGF $\beta$ , IL-6, IL-8 and TNF were normalized for RPLPO human reference gene and analyzed using the  $2^{-\Delta$ Ct method (34). All RT-PCR assays were performed in duplicate to ensure quantitative accuracy.

### ***Isolation and culture of satellite cells***

To further study satellite cells *in vitro*, the second part of the muscle specimen collected before the resistance training session (COPD n=10; controls n=7) was placed in a sterile plate filled with phosphate-buffered saline (PBS), covered and transported on ice under sterile cell culture hood.

### ***Proliferation assay***

After the first passage, satellite cells were plated at a density of  $5 \times 10^4$  cells in a 60mm cultures dish. Every 24h, cells were trypsinized and counted using a hemacytometer during four successive days. Recombinant myostatin (PreproTech, Rocky Hill, New Jersey, United States) were added every day at a concentration of 10ng/ml.

### ***Myogenesis assay***

To measure progression through myogenesis and differentiation,  $2 \times 10^5$  cells were placed in a 100 mm dish after their second passage. Myoblasts proliferate during six days before inducing differentiation for another eight days. Cells were allowed 48 hours to settle and adhere before adding recombinant myostatin (PreproTech) every 48 hours at a concentration of 10ng/ml. Whole cell lysates were performed every 96 hours until complete differentiation for a total of fourteen days in culture.

### ***Western Blotting***

Western blotting was performed using a standard SDS-PAGE procedure and loading 10 mg of whole cell extracts. Proteins of interest were detected using infrared-coupled secondary antibodies (#926-32211 and #926-32220, 1:20 000, Mandel Scientific, Guelph, Ontario, Canada). The antigen-antibody complexes were revealed using an Odyssey<sup>®</sup> infrared imaging system (LI-COR, Lincoln, Nebraska, USA). Western blotting against MyoD, Myf5, Myogenin, MRF4, MHC (Santa Cruz), Numb, Wnt3, Wnt5, Akt, SMAD2, SMAD3, SMAD4, Erk, p38, Notch (Cell Signaling) was performed to quantify protein accumulation in both muscle whole extracts and cultured satellite cells.

### ***Statistical analysis***

Results are expressed as mean ( $\pm$  SEM). Differences for all variables between groups were analyzed, using a one-way analysis of variance (ANOVA). Differences were considered to be significant for  $p < 0.05$ .

## **5.7 Results**

### ***Subject's characteristics***

Anthropometric characteristics and pulmonary function data are provided in Table 1. Patients and controls did not significantly differ regarding age, sex and body mass index. On average, patients had moderate-to-severe airflow obstruction: one patient had stage II, nine patients had stage III, and the remaining patients had stage IV disease according to the GOLD classification (21). As expected, lung function was preserved in controls. Mid-thigh muscle cross sectional area was significantly decreased by 24% in patients with COPD compared to controls ( $p < 0.05$ ).

### ***Myogenic response to resistance training***

We first investigate the expression of myostatin-related and myogenic-related genes at rest and after a bout of resistance training, muscle specimens collected in patients with COPD and controls were processed for immunostaining, real time PCR and western blotting.

### ***Satellite cells quantification***

Pax7 positive cells ratios did not differ between groups pre-exercise (Figure 1A). However, a significant increase (1.5 fold;  $p < 0.05$ ) in the number of Pax7 positive cells post-exercise was observed in controls compared to patients with COPD after resistance training. A representative *vastus lateralis* cryosections immunostained for Pax7 and laminin is depicted in Figure 1B.

### ***Central nucleus quantification***

The number of central nuclei per 100 muscle fibers is significantly higher in patients with COPD compared to controls (figure 2A) before (1.9 fold;  $p < 0.01$ ) and 2 hours (1.5 fold;  $p < 0.01$ ) after the acute bout of resistance exercise. A representative cryosection immunostained for nucleus and laminin is provided in Figure 2B.

### ***Myogenic regulatory factors expression in vivo***

mRNA expression levels were analysed pre- and post-exercise (Table 2). Significant increased expression of Follistatin (1.8 fold), Myf5 (2.1 fold), MyoD (1.6 fold), Myogenin (1.4 fold), MRF4 (2.1 fold), Numb (1.3 fold) and significant decreased expression of Act1IRB (0.6 fold), SMAD4 (0.7 fold), Akt (0.7 fold), cMET (0.5 fold) and Notch (0.5 fold) in patients with COPD compared to controls was observed. Compared to controls, only MRF4 mRNA level remains significantly elevated (1.9 fold) while TGF- $\beta$  mRNA was significantly downregulated post-exercise (0.5 fold) in patients with COPD. As depicted in table 2, no differences for baseline value of local inflammatory markers were seen. All inflammatory markers were influenced in a similar fashion with exercise for both groups, except for IL-8 ( $p=0.03$ ), which was significantly greater in controls.

Total protein content was analysed pre- and post-exercise (Figure 3). Pre-exercise, there was no difference in total protein content for Myf5, MyoD, Myogenin SMAD2, SMAD4 and p21 between groups. However, myostatin protein content was decreased in patients with COPD compared to controls. After exercise, protein accumulation for Numb was significantly increased while it was significantly decreased for MRF4 in patients with COPD compared to controls.

### ***Coordination of the myogenesis process in vitro in patients with COPD***

To understand how the myogenic process is coordinated in muscle tissue of patients with COPD, cell proliferation was assessed and presented in figure 4. Proliferation rate at each time point in the absence and in the presence of recombinant myostatin was similar in patients with COPD compared to control.

Skeletal muscle myogenesis is an ordered process mainly regulated by the Notch and Wnt signalling pathways. Notch and Wnt are responsible for

the transcription of myogenic regulatory factors, which controls satellite cells from their initial activation through their final differentiation. The Notch pathway activates Pax7 and later turns on MyoD and Myf5 transcription during myoblast proliferation. There is a switch between the Notch to the Wnt pathways to specifically enter the differentiation process, which is mainly control by myogenin and MRF4.

In COPD, there was a significant increase in the accumulation of Numb at 10 and 14 days in differentiation medium compared to controls (1.6 and 2.5 fold-increases,  $p < 0.05$ ) (figure 5B). Notch, MyoD and Myf5 protein accumulation during this period was similar between groups (figure 5A-5C-5D). Wnt3 and Wnt5 (figure 5E and F, respectively) were significantly increased in patients with COPD compared to controls at day 10 (2.4 and 2.5 fold-increases ( $p < 0.05$ )). Finally, MRF4 accumulation was significantly greater in patients with COPD compared to controls at day 14 (1.8 fold-increase) ( $p < 0.05$ ) (figure 5H).

The addition of myostatin to the culture medium accentuates some difference between patients with COPD and controls. At day 2, Notch accumulation (figure 5A) was higher by 1.2 fold in patients with COPD compared to controls ( $p < 0.05$ ). The same pattern was observed for Numb, Wnt3 and Wnt5 at day 10 (1.9, 2.2 and 2.9 fold-increases ( $p < 0.05$ )). Accumulation of Myogenin and MRF4 was significantly different in patients with COPD compared to controls at day 2 (0.5 and 3.2 fold-increases) ( $p < 0.05$ ) (figure 5H). SMAD2 and SMAD4 accumulation appear to be downregulated at day 10 in patients with COPD (0.7 fold-decrease and 0.7 fold decrease ( $p < 0.05$ )).

At the end of the myogenic process, the capacity of myoblast to fully differentiate into myotube was determined by quantifying the accumulation of MHC over the differentiation process (Figure 6). After 10 days of differentiation, there was a significant decrease in the accumulation of MHC in patients with COPD compared to controls in the presence or in the

absence of recombinant myostatin (0.4 and 0.5 fold-decrease respectively  
( $p < 0.05$ ).

## 5.8 Discussion

One of the most striking consequences of COPD is the reduction of muscle mass resulting in loss of endurance and strength (5; 15). Even if extensive works are being performed to understand the molecular basis behind this process no clear answer is yet available. Resistance training is a component inserted into a comprehensive pulmonary rehabilitation aimed at maintaining or improving muscle mass. However, such attempt present little to no success in some patient with COPD (9). Myostatin, a known negative regulator of muscle mass, could be the key element responsible for a blunted response of satellite cells to exercise and could prevent patients with COPD to gain lean mass. In the present study, we sought to determine the regenerative capacity of the limb muscle of patients with COPD at rest and its response after an acute bout of resistance training. The main findings of this study support the notion that, at rest, lowers limb muscle are under an appropriate environment for muscle regeneration in patients with COPD. This statement is supported by the fact that occurrence of central nuclei is higher and that myogenic regulatory factor mRNA expression levels are increased and paralleled by a decreased mRNA content of the myostatin signalling pathways in patients with COPD. Resistance training in patients with COPD as opposed to what is observed in controls poorly modifies this biological portrait. To further investigate the dynamic plasticity of the regenerative process in response to myostatin, isolated satellite cells were cultured with or without recombinant myostatin. It was found, in these specific conditions, that satellite cells isolated from patients with COPD have a similar response to myostatin compared to those isolated from controls. More importantly, it was demonstrated that myogenesis was impaired in satellite cells isolated from patients with COPD leading to a significant reduction in MHC accumulation.

In order to sustain an appropriate regenerative function and to be able to support muscle fiber repair, satellite cell population must remains constant during lifespan. The identification of genes specifically expressed in satellite cells, such as the paired box transcription factor (Pax7) (55) allows for their

identification using standard microscopy. Pax7 is required for postnatal muscle growth and maintenance of the satellite cell population, and participate in the establishment of the myogenic lineage during early development (53). In our study, the density of satellite cells was similar in patients with COPD and controls pre-exercise. However, post-exercise the number of Pax7 positive cells significantly increases only in controls. Lack in increase number of Pax7 positive cells in patients with COPD could be explain either by an insufficient level of exercise to activate them or an intrinsic resistance to their activation. Increased number of senescent satellite cells in limb muscle of patient with COPD could explain the latter. We recently demonstrated that telomere lengths were decreased in lower limb muscle of patients with COPD (59). Decreased telomere length has been suggested to be the result of an increase demand of activation/repair cycle during the course of the disease and shorten telomere certainly leads to cellular senescence (18). Systemic inflammation and oxidative stress are both hallmarks encounter in COPD and known to negatively affect telomere length (25).

Because the environment is known for its critical role in the activation and proliferation process of satellite cells (10), it is likely that systemic environment specifically found in patients with COPD (65) could impair satellite cell activity resulting in muscle regeneration defect. Using parabiotic pairing experiment, Conboy et al (2005) showed that systemic factors from young mice promote proliferation and regeneration of satellite cells from aged mice whereas, systemic factors from aged mice fails to promote satellite cells regeneration. In COPD, systemic inflammation and oxidative stress could hinder the signal of activating cytokine to the satellite cells. In support of this assumption, increased systemic level of IL-6 and IL-8 was found in patients with COPD. Systemic inflammation (3; 14; 43) and anabolic/catabolic imbalance (16) are often regarded as important factors contributing to peripheral muscle atrophy in patients with COPD. They could also affect satellite cell behavior by decreasing their ability to sense their environment,



blunt their activation response and alter their proliferation and differentiation capacity. Because an inflammatory response is typical during the recuperation phase of resistance training (7), our data demonstrate that exercise intensity was sufficient to induce a local inflammatory response in lower limb muscle (Table 2).

The number of central myonuclei is an indication of muscle damage and committed satellite cells into the repair process (12; 37; 56). The proof of this concept has been demonstrated using bupivacaine as a muscle damage inducer, central nucleus were present as early as 15 minutes and lasted until 24 hours post-injection (4). In this study, we found a higher ratio of central nuclei in patients with COPD when compared to controls pre-exercise, which suggest an increased number of regenerative events in this group at rest. This finding is in agreement with previous data recently published by our group in two distinct populations of patients (59). This observation supports the hypothesis that muscle tissue might be more exposed to injury sometimes during the progression of the disease (44; 46; 52). Although an attractive hypothesis, underlying mechanisms have yet to be demonstrated. The number of central nuclei post-exercise is still higher in patients with COPD but the relative increase seen after exercise is similar in both groups. This observation demonstrates that regenerative response is still present in COPD, likely at a lesser extent (59).

Adult skeletal muscle fibers are multinucleated cells in which each myonucleus controls the production of mRNA and protein over a finite volume of cytoplasm. To increase the volume of single muscle fibers, the transcription machinery has to increase the transcription of myogenic genes and protein synthesis and/or satellite cells have to add their myonuclei to the muscle fibers (28; 29). In our study, we have shown that pre-exercise several genes involved in myogenesis and myostatin signaling are significantly different in patients with COPD compared to controls. Overall, myogenesis related genes tend to be upregulated and myostatin related genes tend to be downregulated

in patients with COPD. This internal milieu is in favour to promote muscle regeneration. Post-exercise, TGF $\beta$  and Notch are downregulated while MRF4 and Myf5 are upregulated. In the literature, resistance training has been shown to act on both processes. For instance, MyoD, myogenin, and MRF4 mRNA have been shown to be significantly elevated 8, 8-12, and 2-4 hours after exercise, respectively (66), suggesting that MRF genes are responsive to single bouts of high-intensity resistance exercise. However, a single bout of high-intensity resistance exercise has shown no effect on MRF4 and Myf5 mRNA expression 24 hours after exercise (66). The timing between the resistance training exercise and the muscle biopsy 2 hours post-exercise is likely explaining the absence of modulation in protein content post-exercise.

In patients with COPD, the switch between Notch (proliferation) and Wnt (differentiation) signaling pathway is dysfunctional leading to a sustained proliferative state. Furthermore, the increased number of central nuclei observed in this group is in line with the notion that satellite cells are under a sustained proliferative state. Muscle cells in culture try to differentiate by decreasing Notch activity with a concomitant increase in Wnt activity. This specific coordinated process was observed in this study. However, even if the transition of Notch and Wnt activities were present, the last step of differentiation was clearly affected in muscle cells from patients with COPD. Indeed, the reduced MHC protein accumulation observed in muscle cells from patients with COPD is a strong evidence in favour of an altered transition between Notch and Wnt leading to an altered differentiation capacity. It can be speculated that the inability of myoblasts to fuse together, a prerequisite step to engage the late MRF into their transcriptional activity, could explain this finding (45; 61). Altered transitional signalling in the Notch/Wnt balance is a likely explanation for this observation previously demonstrated (59). The finding that impaired Notch signaling may be partly responsible for the loss of myogenic potential in aged muscle is intriguing, and provides a potential clue into the mechanisms underlying this altered regenerative process (8; 12).

Myostatin is a negative regulator of the muscle mass acting mainly by controlling the activation, the proliferation and the differentiation of satellite cells. Since myostatin upregulation has been link to muscle wasting disorder we wanted to assess is implication in muscle dysfunction of patients with COPD. Previous studies have shown in patients with COPD an increased level of serum myostatin (27), an increased myostatin mRNA transcript in the quadriceps (48) and an inverse correlation between the quadriceps myostatin mRNA and the quadriceps strength (38). In our study, we found no difference in the quadriceps myostatin mRNA before and after exercise between groups. Two hours after the resistance training exercise bout, the mRNA level of myostatin decrease to promote muscle regeneration in a similar extend between patients with COPD and controls. However, at the protein level, we demonstrated a significant decrease in the myostatin content in patients with COPD at rest compared to controls. In the literature, other study investigating myostatin protein content in the quadriceps of patient with COPD are unavailable. However, a study has shown an increased level of myostatin in the diaphragm (58). In our study, myostatin do not appear to have a significant impact on satellite cells and on skeletal muscle dysfunction even if the literature provides a range of various results. Therefore, we performed experiment directly on primary muscle cells to assess their response with recombinant myostatin during proliferation and differentiation. Overall, the addition of myostatin does not alter the behavior of satellite cells during myogenesis. Myostatin responses appear to be normal in the skeletal muscle and in satellite cells of patients with COPD.

### **Summary and Conclusion**

We provide strong evidence of a defect in satellite cells biology in limb muscle of patient with COPD. Before exercise, limb muscles of patient with COPD are more subjected to damage causing an increase regenerative activity and a lower myostatin signaling. After an acute bout of resistance training, gene expression in both groups appears to be similar. Because

cultured satellite cells isolated from muscle samples have atypical expression pattern of Notch and Wnt signalling that results in poor MHC accumulation in myotubes, we believe that muscle regeneration is impaired in patients with COPD. The relevance of this finding for the development of muscle atrophy in this disease will need to be considered in future studies. Further efforts will be needed to delineate how the *in vivo* environment (growth factor availability, nature and intensity of the stressors) can affect the intrinsic capacity of satellite cells to regenerate skeletal muscle.

## **5.9 Acknowledgements**

The authors acknowledge the contribution of Marthe Bélanger, Marie-Josée Breton, Brigitte Jean, Josée Picard for their help in accomplishing this study.

## 5.10 References

1. American Thoracic Society and European Respiratory Society. Standards for the diagnosis and treatment of patients with chronic obstructive pulmonary disease. 2004. 6-11-0090.
2. Bamman MM, Clarke MS, Feedback DL, Talmadge RJ, Stevens BR, Lieberman SA and Greenisen MC. Impact of resistance exercise during bed rest on skeletal muscle sarcopenia and myosin isoform distribution. *J Appl Physiol* 84: 157-163, 1998.
3. Barnes PJ and Celli BR. Systemic manifestations and comorbidities of COPD. *Eur Respir J* 33: 1165-1185, 2009.
4. Benoit PW and Belt WD. Destruction and regeneration of skeletal muscle after treatment with a local anaesthetic, bupivacaine (Marcaine). *J Anat* 107: 547-556, 1970.
5. Bernard S, LeBlanc P, Whittom F, Carrier G, Jobin J, Belleau R and Maltais F. Peripheral muscle weakness in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 158: 629-634, 1998.
6. Brooks SV and Faulkner JA. Skeletal muscle weakness in old age: underlying mechanisms. *Med Sci Sports Exerc* 26: 432-439, 1994.
7. Calle MC and Fernandez ML. Effects of resistance training on the inflammatory response. *Nutr Res Pract* 4: 259-269, 2010.
8. Carlson ME, Hsu M and Conboy IM. Imbalance between pSmad3 and Notch induces CDK inhibitors in old muscle stem cells. *Nature* 454: 528-532, 2008.
9. Casaburi R, Bhasin S, Cosentino L, Porszasz J, Somfay A, Lewis MI, Fournier M and Storer TW. Effects of testosterone and resistance

training in men with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 170: 870-878, 2004.

10. Charge SB and Rudnicki MA. Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiol Rev* 84: 209-238, 2004.

11. Collins CA and Partridge TA. Self-renewal of the adult skeletal muscle satellite cell. *Cell Cycle* 4: 1338-1341, 2005.

12. Conboy IM, Conboy MJ, Wagers AJ, Girma ER, Weissman IL and Rando TA. Rejuvenation of aged progenitor cells by exposure to a young systemic environment. *Nature* 433: 760-764, 2005.

13. Crisa A, Marchitelli C, Savarese MC and Valentini A. Sequence analysis of myostatin promoter in cattle. *Cytogenet Genome Res* 102: 48-52, 2003.

14. Crul T, Spruit MA, Gayan-Ramirez G, Quarck R, Gosselink R, Troosters T, Pitta F and Decramer M. Markers of inflammation and disuse in *vastus lateralis* of chronic obstructive pulmonary disease patients. *Eur J Clin Invest* 37: 897-904, 2007.

15. Debigare R and Maltais F. The major limitation to exercise performance in COPD is lower limb muscle dysfunction. *J Appl Physiol* 105: 751-753, 2008.

16. Debigare R, Marquis K, Cote CH, Tremblay RR, Michaud A, LeBlanc P and Maltais F. Catabolic/anabolic balance and muscle wasting in patients with COPD. *Chest* 124: 83-89, 2003.

17. Debigare R, Marquis K, Cote CH, Tremblay RR, Michaud A, Leblanc P and Maltais F. Catabolic/anabolic balance and muscle wasting in patients with COPD. *Chest* 124: 83-89, 2003.

18. Decary S, Hamida CB, Mouly V, Barbet JP, Hentati F and Butler-Browne GS. Shorter telomeres in dystrophic muscle consistent with extensive regeneration in young children. *Neuromuscul Disord* 10: 113-120, 2000.
19. Doucet M, Russell AP, Leger B, Debigare R, Joanisse DR, Caron MA, LeBlanc P and Maltais F. Muscle atrophy and hypertrophy signaling in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 176: 261-269, 2007.
20. Durieux AC, Amirouche A, Banzet S, Koulmann N, Bonnefoy R, Padeloup M, Mouret C, Bigard X, Peinnequin A and Freyssenet D. Ectopic expression of myostatin induces atrophy of adult skeletal muscle by decreasing muscle gene expression. *Endocrinology* 148: 3140-3147, 2007.
21. Fabbri LM and Hurd SS. Global Strategy for the Diagnosis, Management and Prevention of COPD: 2003 update. *Eur Respir J* 22: 1-2, 2003.
22. Franssen FM, Broekhuizen R, Janssen PP, Wouters EF and Schols AM. Effects of whole-body exercise training on body composition and functional capacity in normal-weight patients with COPD. *Chest* 125: 2021-2028, 2004.
23. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD). Global Strategy for the Diagnosis, Management and Prevention of COPD. 2010.
24. Gosselink R, Troosters T and Decramer M. Peripheral muscle weakness contributes to exercise limitation in COPD. *Am J Respir Crit Care Med* 153: 976-980, 1996.



25. Houben JM, Mercken EM, Ketelslegers HB, Bast A, Wouters EF, Hageman GJ and Schols AM. Telomere shortening in chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Med* 103: 230-236, 2009.
26. Hyatt JP, McCall GE, Kander EM, Zhong H, Roy RR and Huey KA. PAX3/7 expression coincides with MyoD during chronic skeletal muscle overload. *Muscle Nerve* 38: 861-866, 2008.
27. Ju CR and Chen RC. Serum myostatin levels and skeletal muscle wasting in chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Med* 106: 102-108, 2012.
28. Kadi F, Johansson F, Johansson R, Sjostrom M and Henriksson J. Effects of one bout of endurance exercise on the expression of myogenin in human quadriceps muscle. *Histochem Cell Biol* 121: 329-334, 2004.
29. Kadi F, Schjerling P, Andersen LL, Charifi N, Madsen JL, Christensen LR and Andersen JL. The effects of heavy resistance training and detraining on satellite cells in human skeletal muscles. *J Physiol* 558: 1005-1012, 2004.
30. Kim JS, Cross JM and Bamman MM. Impact of resistance loading on myostatin expression and cell cycle regulation in young and older men and women. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 288: E1110-E1119, 2005.
31. Langley B, Thomas M, Bishop A, Sharma M, Gilmour S and Kambadur R. Myostatin inhibits myoblast differentiation by down-regulating MyoD expression. *J Biol Chem* 277: 49831-49840, 2002.
32. Lee SJ and McPherron AC. Regulation of myostatin activity and muscle growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 9306-9311, 2001.
33. Lindstrom M and Thornell LE. New multiple labelling method for improved satellite cell identification in human muscle: application to a cohort of power-lifters and sedentary men. *Histochem Cell Biol* 2009.

34. Livak KJ and Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C(T)}$  Method. *Methods* 25: 402-408, 2001.
35. Llovera M, Garcia-Martinez C, Agell N, Lopez-Soriano FJ, Authier FJ, Gherardi RK and Argiles JM. Ubiquitin and proteasome gene expression is increased in skeletal muscle of slim AIDS patients. *Int J Mol Med* 2: 69-73, 1998.
36. Ma K, Mallidis C, Artaza J, Taylor W, Gonzalez-Cadavid N and Bhasin S. Characterization of 5'-regulatory region of human myostatin gene: regulation by dexamethasone in vitro. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 281: E1128-E1136, 2001.
37. Maier A, Gambke B and Pette D. Degeneration-regeneration as a mechanism contributing to the fast to slow conversion of chronically stimulated fast-twitch rabbit muscle. *Cell Tissue Res* 244: 635-643, 1986.
38. Man C, Natanek SA, Riddoch-Contreras J, Lewis A, Marsh GS, Kemp PR and Polkey MI. Quadriceps myostatin expression in COPD. *Eur Respir J* 36: 686-688, 2010.
39. Marquis K, Debigare R, Lacasse Y, LeBlanc P, Jobin J, Carrier G and Maltais F. Midthigh muscle cross-sectional area is a better predictor of mortality than body mass index in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 166: 809-813, 2002.
40. Massague J. How cells read TGF-beta signals. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1: 169-178, 2000.
41. Mauro A. Satellite cell of skeletal muscle fibers. *J Cell Biol* 9: 493-495, 1961.
42. McFarlane C, Plummer E, Thomas M, Hennebry A, Ashby M, Ling N, Smith H, Sharma M and Kambadur R. Myostatin induces cachexia by

activating the ubiquitin proteolytic system through an NF-kappaB-independent, FoxO1-dependent mechanism. *J Cell Physiol* 209: 501-514, 2006.

43. Mitch WE and Price SR. Mechanisms activating proteolysis to cause muscle atrophy in catabolic conditions. *J Ren Nutr* 13: 149-152, 2003.

44. Moore BJ, Miller MJ, Feldman HA and Reid MB. Diaphragm atrophy and weakness in cortisone-treated rats. *J Appl Physiol* 67: 2420-2426, 1989.

45. Oexle K and Kohlschutter A. Cause of progression in Duchenne muscular dystrophy: impaired differentiation more probable than replicative aging. *Neuropediatrics* 32: 123-129, 2001.

46. Orozco-Levi M. Structure and function of the respiratory muscles in patients with COPD: impairment or adaptation? *Eur Respir J Suppl* 46: 41s-51s, 2003.

47. Partridge TA. Cells that participate in regeneration of skeletal muscle. *Gene Ther* 9: 752-753, 2002.

48. Plant PJ, Brooks D, Faughnan M, Bayley T, Bain J, Singer L, Correa J, Pearce D, Binnie M and Batt J. Cellular markers of muscle atrophy in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Cell Mol Biol* 42: 461-471, 2010.

49. Price SR, Bailey JL, Wang X, Jurkovitz C, England BK, Ding X, Phillips LS and Mitch WE. Muscle wasting in insulinopenic rats results from activation of the ATP-dependent, ubiquitin-proteasome proteolytic pathway by a mechanism including gene transcription. *J Clin Invest* 98: 1703-1708, 1996.

50. Probst VS, Troosters T, Pitta F, Decramer M and Gosselink R. Cardiopulmonary stress during exercise training in patients with COPD. *Eur Respir J* 27: 1110-1118, 2006.

51. Quanjer PH, Tammeling GJ, Cotes JE, Pedersen OF, Peslin R and Yernault JC. Lung volumes and forced ventilatory flows. Report Working Party Standardization of Lung Function Tests, European Community for Steel and Coal. Official Statement of the European Respiratory Society. *Eur Respir J Suppl* 16: 5-40, 1993.
52. Reid WD and MacGowan NA. Respiratory muscle injury in animal models and humans. *Mol Cell Biochem* 179: 63-80, 1998.
53. Relaix F, Rocancourt D, Mansouri A and Buckingham M. A Pax3/Pax7-dependent population of skeletal muscle progenitor cells. *Nature* 435: 948-953, 2005.
54. Salerno MS, Thomas M, Forbes D, Watson T, Kambadur R and Sharma M. Molecular analysis of fiber type-specific expression of murine myostatin promoter. *Am J Physiol Cell Physiol* 287: C1031-C1040, 2004.
55. Seale P, Sabourin LA, Girgis-Gabardo A, Mansouri A, Gruss P and Rudnicki MA. Pax7 is required for the specification of myogenic satellite cells. *Cell* 102: 777-786, 2000.
56. Snow MH. An autoradiographic study of satellite cell differentiation into regenerating myotubes following transplantation of muscles in young rats. *Cell Tissue Res* 186: 535-540, 1978.
57. Spiller MP, Kambadur R, Jeanplong F, Thomas M, Martyn JK, Bass JJ and Sharma M. The myostatin gene is a downstream target gene of basic helix-loop-helix transcription factor MyoD. *Mol Cell Biol* 22: 7066-7082, 2002.
58. Testelmans D, Crul T, Maes K, Agten A, Crombach M, Decramer M and Gayan-Ramirez G. Atrophy and hypertrophy signalling in the diaphragm of patients with COPD. *Eur Respir J* 35: 549-556, 2010.

59. Theriault ME, Pare ME, Maltais F and Debigare R. Satellite Cells Senescence in Limb Muscle of Severe Patients with COPD. PLoS ONE 7: e39124, 2012.
60. Tiao G, Fagan JM, Samuels N, James JH, Hudson K, Lieberman M, Fischer JE and Hasselgren PO. Sepsis stimulates nonlysosomal, energy-dependent proteolysis and increases ubiquitin mRNA levels in rat skeletal muscle. J Clin Invest 94: 2255-2264, 1994.
61. Timchenko NA, Iakova P, Cai ZJ, Smith JR and Timchenko LT. Molecular basis for impaired muscle differentiation in myotonic dystrophy. Mol Cell Biol 21: 6927-6938, 2001.
62. Tisdale MJ. Cachexia in cancer patients. Nat Rev Cancer 2: 862-871, 2002.
63. Troosters T, Probst VS, Crul T, Pitta F, Gayan-Ramirez G, Decramer M and Gosselink R. Resistance training prevents deterioration in quadriceps muscle function during acute exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. Am J Respir Crit Care Med 181: 1072-1077, 2010.
64. Willoughby DS and Nelson MJ. Myosin heavy-chain mRNA expression after a single session of heavy-resistance exercise. Med Sci Sports Exerc 34: 1262-1269, 2002.
65. Wouters EF, Groenewegen KH, Dentener MA and Vernooy JH. Systemic inflammation in chronic obstructive pulmonary disease: the role of exacerbations. Proc Am Thorac Soc 4: 626-634, 2007.
66. Yang Y, Creer A, Jemiolo B and Trappe S. Time course of myogenic and metabolic gene expression in response to acute exercise in human skeletal muscle. J Appl Physiol 98: 1745-1752, 2005.

67. Zammit PS, Golding JP, Nagata Y, Hudon V, Partridge TA and Beauchamp JR. Muscle satellite cells adopt divergent fates: a mechanism for self-renewal? *J Cell Biol* 166: 347-357, 2004.

## 5.11 Tables

**Table 1: Subjects characteristics**

	<b>Control</b> (n= 10)	<b>COPD</b> (n=11)
<b>Age (years)</b>	65 ± 2	67 ± 1
<b>BMI (kg/m<sup>2</sup>)</b>	28 ± 1	27 ± 1
<b>FEV<sub>1</sub>, L</b>	3.4 ± 0.1	1.3 ± 0.1 *
<b>FEV<sub>1</sub>, % predicted</b>	118 ± 3	45 ± 2 *
<b>FEV<sub>1</sub> / FVC, %</b>	79 ± 1	38 ± 1 *
<b>TLC, % predicted</b>	106 ± 3	122 ± 2 *
<b>RV, % predicted</b>	97 ± 5	167 ± 7 *
<b>DL<sub>CO</sub>, % predicted</b>	103 ± 2	60 ± 3 *
<b>MTCSA (cm<sup>2</sup>)</b>	113.8 ± 3.8	86.2 ± 2.6 *
<i>Plasma cytokines PRE</i>		
<b>IL-6 (pg/ml)</b>	2.0 ± 0.4	3.3 ± 0.5 †
<b>IL-8 (pg/ml)</b>	4.4 ± 0.6	6.4 ± 0.8 *
<b>TNF (pg/ml)</b>	1.9 ± 0.4	1.7 ± 0.1
<i>Plasma cytokines POST</i>		
<b>IL-6 (pg/ml)</b>	2.8 ± 0.7	3.6 ± 0.6
<b>IL-8 (pg/ml)</b>	8.3 ± 2.6	5.5 ± 0.7

TNF (pg/ml)	1.9 ± 0.4	1.7 ± 0.1
-------------	-----------	-----------

---

**Definition of abbreviations: BMI = Body mass index; FEV<sub>1</sub> = Forced expiratory volume in 1 second; TLC = total lung capacity; RV = Residual volume; DLCO = Diffusing capacity of carbon monoxide; MTCSA = Mid-thigh cross-sectional area.**

\* Statistically significant difference p<0.05.

† Statistically significant difference p<0.1.



**Table 2: mRNA level expression in limb muscles of controls and patients with COPD before and after the acute bout of resistance exercise**

mRNA	PRE-EXERCISE		POST-EXERCISE	
	Controls	COPD	Controls	COPD
<i>Myostatin</i>				
<b>Myostatin</b>	1.0 ± 0.2	0.9 ± 0.2	0.3 ± 0.1	0.3 ± 0.1
<b>Follistatin</b>	1.0 ± 0.1	1.8 ± 0.3 *	1.0 ± 0.3	0.9 ± 0.2
<b>ActIIIRB</b>	1.0 ± 0.2	0.6 ± 0.2 *	0.3 ± 0.1	0.3 ± 0.1
<b>SMAD2</b>	1.0 ± 0.3	0.6 ± 0.3	0.4 ± 0.3	0.6 ± 0.3
<b>SMAD3</b>	1.0 ± 0.4	0.3 ± 0.1	1.6 ± 1.0	0.2 ± 0.1
<b>SMAD4</b>	1.0 ± 0.1	0.7 ± 0.1 *	0.5 ± 0.1	0.3 ± 0.1
<b>TGFβ</b>	1.0 ± 0.1	0.7 ± 0.1 *	1.1 ± 0.2	0.6 ± 0.1 *
<b>Akt</b>	1.0 ± 0.1	0.7 ± 0.1 *	0.5 ± 0.1	0.4 ± 0.1
<b>Atrogin1</b>	1.0 ± 0.2	0.8 ± 0.1	0.8 ± 0.2	0.6 ± 0.1
<i>Myogenesis</i>				
<b>cMet</b>	1.0 ± 0.2	0.5 ± 0.2 *	0.6 ± 0.1	0.6 ± 0.2
<b>MyoD</b>	1.0 ± 0.1	1.6 ± 0.3 *	0.5 ± 0.1	0.7 ± 0.1
<b>Myf5</b>	1.0 ± 0.1	2.1 ± 0.6 *	1.0 ± 0.1	1.8 ± 0.5 *
<b>Myogenin</b>	1.0 ± 0.1	1.4 ± 0.3 *	0.8 ± 0.2	1.0 ± 0.2
<b>MRF4</b>	1.0 ± 0.1	2.1 ± 0.5 *	1.9 ± 0.4	3.5 ± 0.9 *
<b>Notch1</b>	1.0 ± 0.1	0.5 ± 0.1 *	0.7 ± 0.1	0.5 ± 0.1 *
<b>Pax7</b>	1.0 ± 0.2	0.9 ± 0.3	0.7 ± 0.2	0.8 ± 0.3
<b>Wnt</b>	1.0 ± 0.2	0.9 ± 0.1	0.5 ± 0.1	0.4 ± 0.1

<b>Numb</b>	1.0 ± 0.1	1.3 ± 0.1 *	1.0 ± 0.1	0.9 ± 0.1
<i>Inflammation</i>				
<b>IL-6</b>	1.0 ± 0.1	1.9 ± 0.3	29.6 ± 8.3	75.2 ± 23.4
<b>IL-8</b>	1.0 ± 0.4	1.1 ± 0.7	6.3 ± 3.6	2.6 ± 0.8
<b>TNF</b>	1.0 ± 0.1	8.7 ± 3.1	2.2 ± 0.3	1.3 ± 0.1

\* Statistically significant difference p<0.05.

## 5.12 Figure legends

**Figure 1A:** *Vastus lateralis* muscle cryosections were immunostained for co-expression and localization of nuclear Paired box transcription factor 7 (green), DAPI (blue) and laminin (red). Labeled nuclei located deep to the basal lamina and positive for Pax7 were counted as satellite cells (white arrow).

**Figure 1B:** Labeled nuclei located deep to the basal lamina and positive for Pax7 were counted as satellite cells. The number of satellite cells is expressed over 100 fibers and reported as a ratio. Ratios are calculated from 10 controls and 11 patients with COPD.

\* represents a statistically significant difference pre-exercise compared to post exercise ( $p < 0.05$ ).

**Figure 2A:** Cryosections were analyzed by immunostaining for nuclei (blue) and laminin (red). Immuno-detection is shown for 10 $\mu$ m skeletal muscle cryosections. The number of central nuclei (white arrows) is expressed over 100 fibers and reported as a ratio.

**Figure 2B:** The total numbers of central nuclei were quantified per 100 fibers for 10 controls and 11 patients with COPD. Nucleus inside the perimeter of a given fiber delimited by laminin was counted as a central nucleus, expressed over 100 fibers and reported as a ratio.

\* represents a statistically significant difference pre-exercise compared to post exercise ( $p < 0.05$ ).

† represents a statistically significant difference between controls and patients with COPD ( $p < 0.05$ ).

‡ represents a statistically significant difference between patients with COPD and controls and pre-exercise and post-exercise ( $p < 0.05$ ).

**Figure 3:** Western blot against Myostatin, SMAD2, SMAD3, SMAD4, p21, MyoD, Myf5, Numb, Myogenin and MRF4 on total protein extract of the muscle biopsies obtained from the *vastus lateralis*. Results are reported as a percentage compared to controls subjects.

\* represents a statistically significant difference ( $p < 0.05$ ).

**Figure 4:** Proliferative potential in satellite cells isolated and cultured from controls ( $n=7$ ) without recombinant myostatin (white bars) or with recombinant myostatin (light grey) and patients with COPD ( $n=8$ ) without recombinant myostatin (dark grey bars) or with recombinant myostatin (black bars). Following the first passage,  $5 \times 10^4$  cells were seeded on a 60mm-dish and were counted every next 24 hours during 96 consecutive hours. Recombinant myostatin were added every day at a concentration of 10 ng/ml. Values are expressed as mean  $\pm$  SEM.

**Figure 5:** A) Notch, B) Numb, C) MyoD, D) Myf5, E) Wnt3, F) Wnt5, G) Myogenin and H) MRF4 protein accumulation during myogenesis in satellite cells isolated and cultured from controls ( $n=7$ ) without recombinant myostatin (white bars) or with recombinant myostatin (light grey) and patients with COPD ( $n=8$ ) without recombinant myostatin (dark grey bars) or with recombinant myostatin (black bars). Protein extraction was performed every four days starting from day 2, the first six days during the myoblasts phase and the last eight days during the differentiation (day 6 to day 14). Recombinant myostatin were added every day at a concentration of 10 ng/ml. Signal analysis was calculated by densitometry and reported over a positive control.

\* represents a statistically significant difference ( $p < 0.05$ ).

**Figure 6:** Skeletal myosin fast twitch protein accumulation during myogenesis in satellite cells isolated and cultured from controls ( $n=7$ ) without recombinant myostatin (white bars) or with recombinant myostatin (light grey) and patients

with COPD (n=8) without recombinant myostatin (dark grey bars) or with recombinant myostatin (black bars). Protein extraction was performed daily after initial differentiation. Signal analysis was calculated by densitometry and reported over a positive control. Recombinant myostatin were added every day at a concentration of 10 ng/ml.

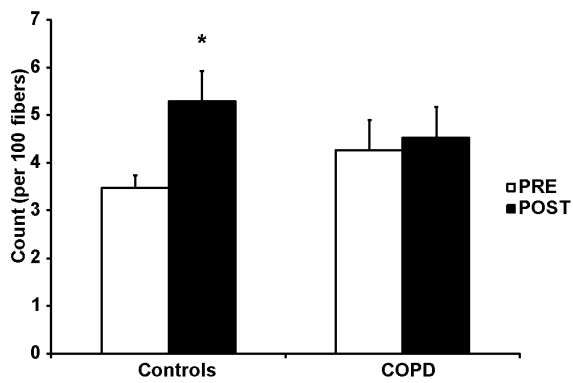
\* represents a statistically significant difference ( $p < 0.05$ ).

**Figure 7:** A) SMAD2, B) SMAD3, C) SMAD4, D) pAkt/Akt ratio, E) pp38/p38 ratio, F) pErk/Erk ratio protein accumulation during myogenesis in satellite cells isolated and cultured from controls (n=7) without recombinant myostatin (white bars) or with recombinant myostatin (light grey) and patients with COPD (n=8) without recombinant myostatin (dark grey bars) or with recombinant myostatin (black bars). Protein extraction was performed every four days starting from day 2, the first six days during the myoblasts phase and the last eight days during the differentiation (day 6 to day 14). Recombinant myostatin were added every day at a concentration of 10 ng/ml. Signal analysis was calculated by densitometry and reported over a positive control.

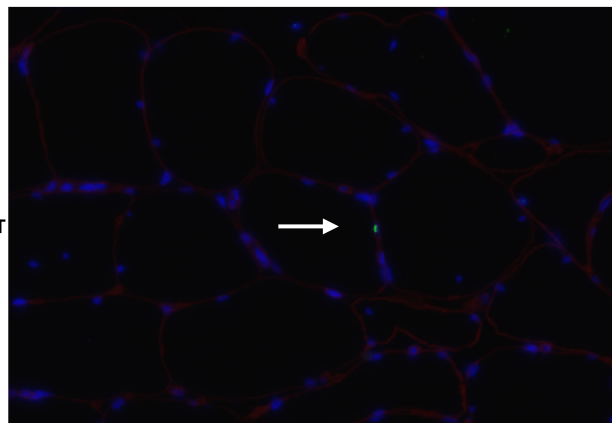
\* represents a statistically significant difference ( $p < 0.05$ ).

## 5.13 Figures

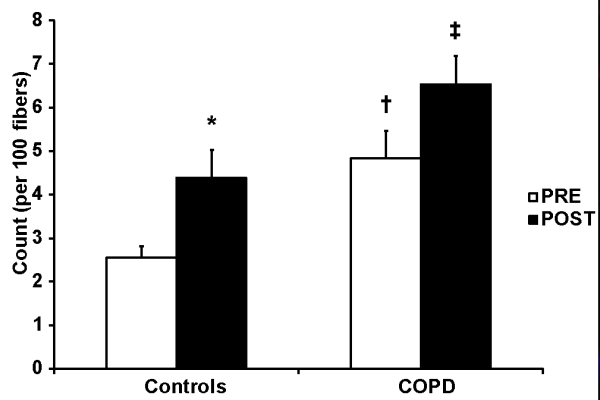
1A



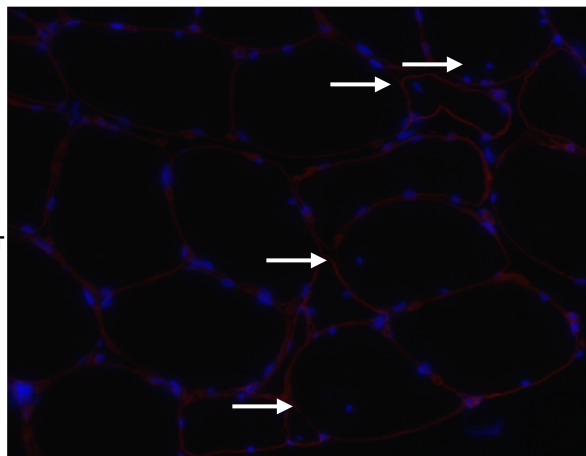
B

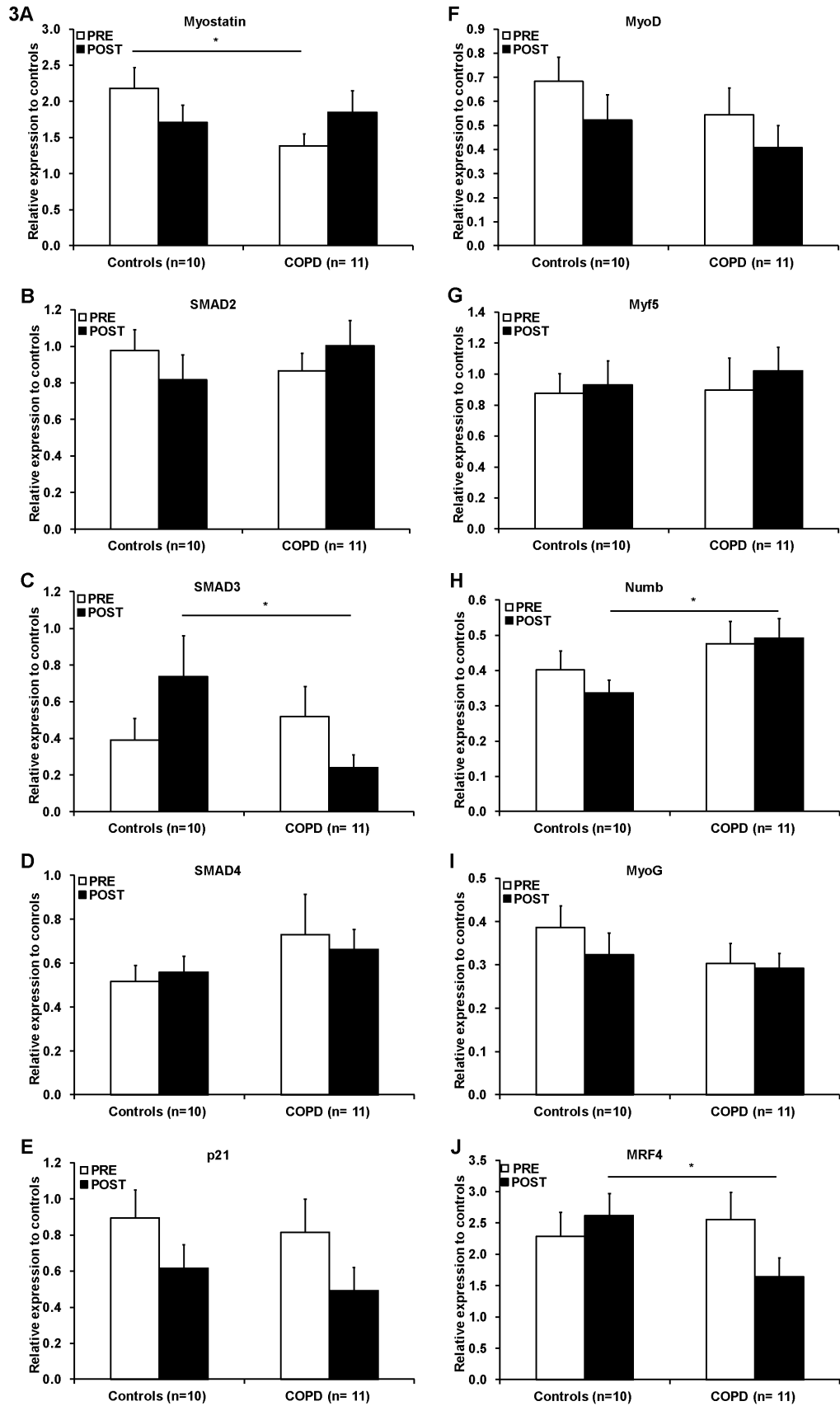


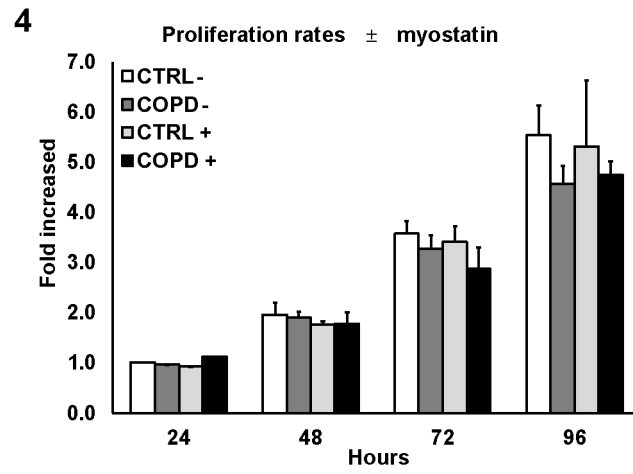
2A



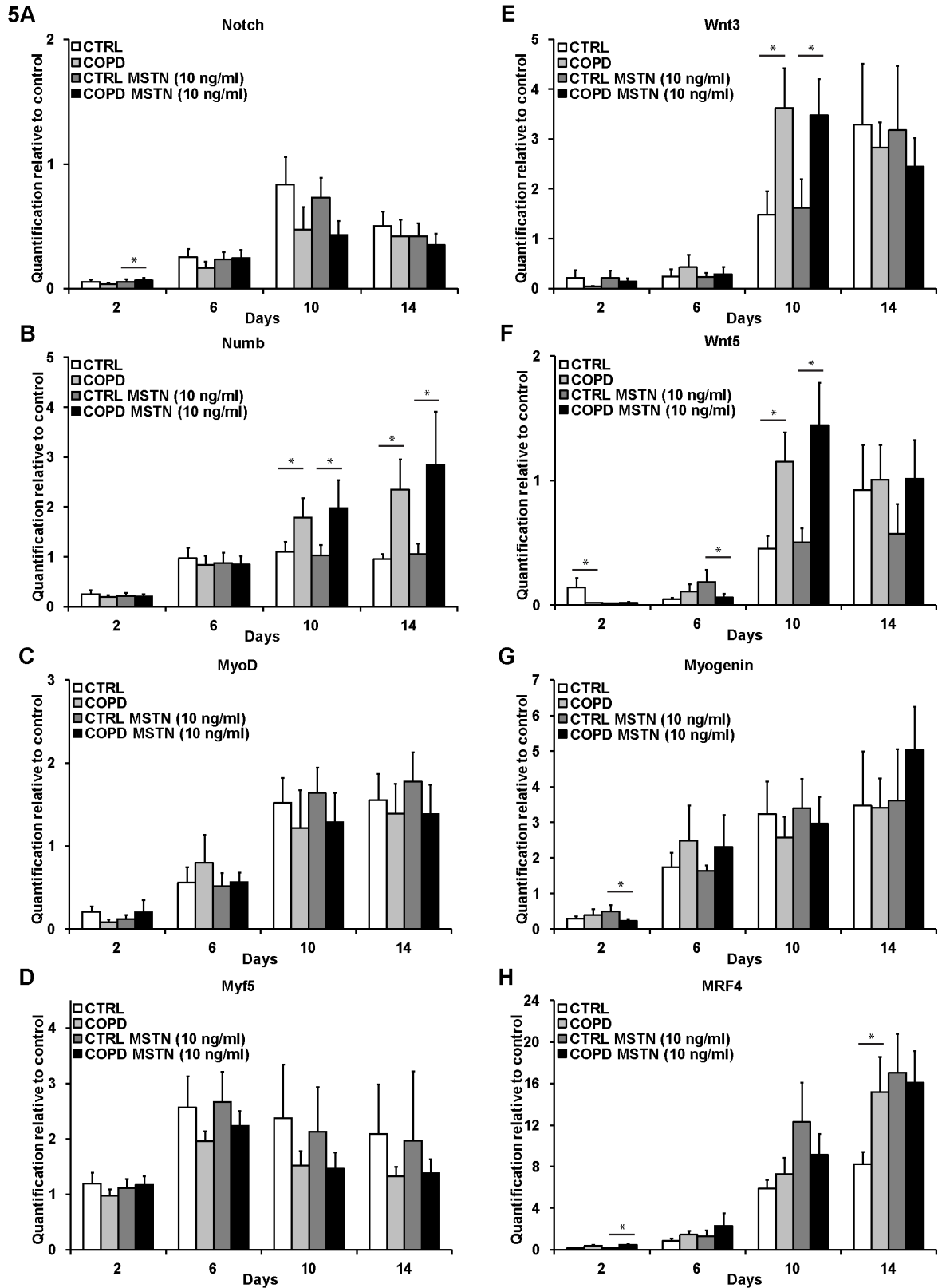
B

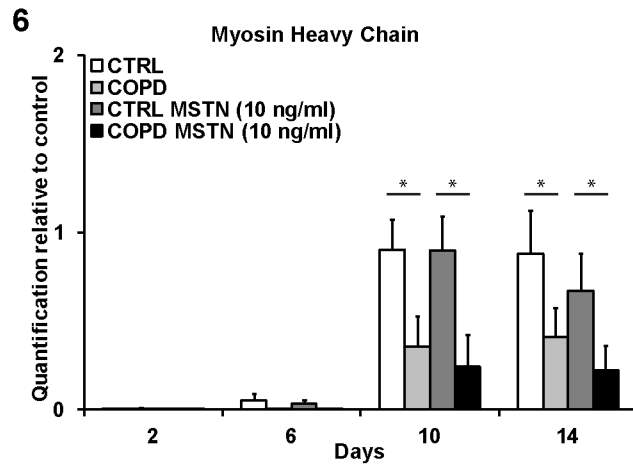


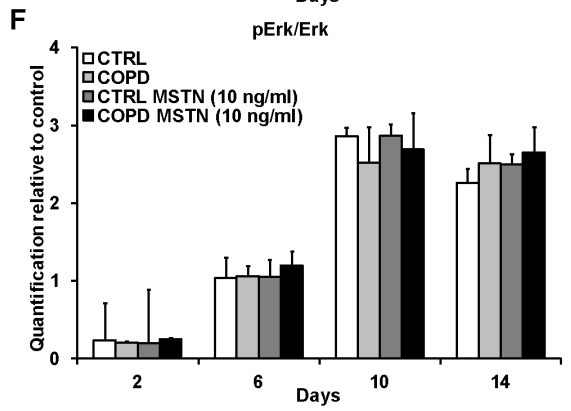
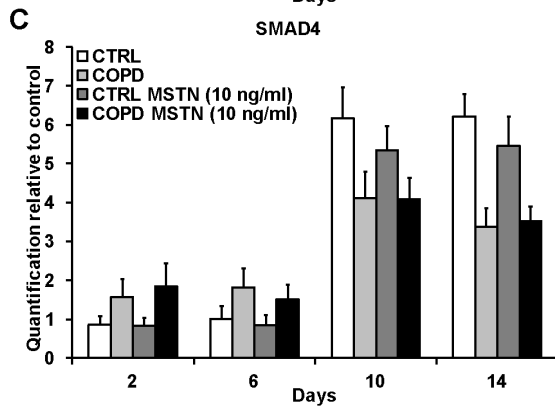
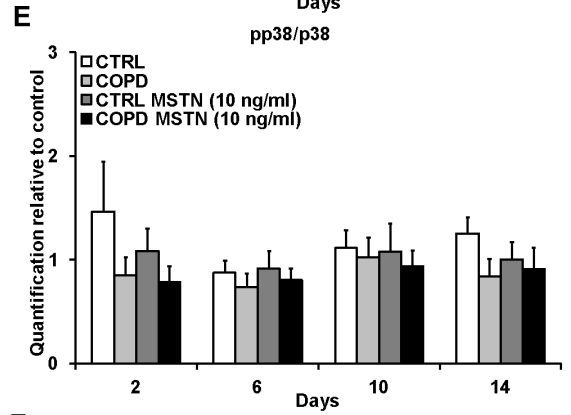
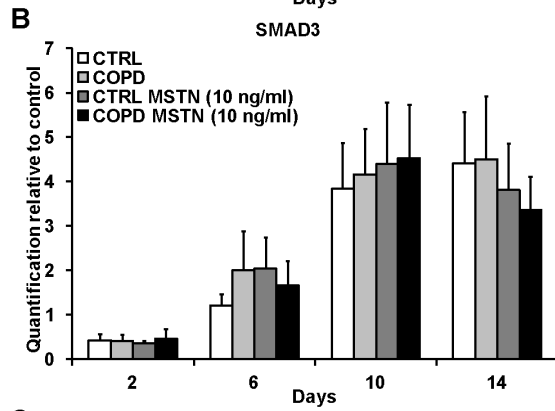
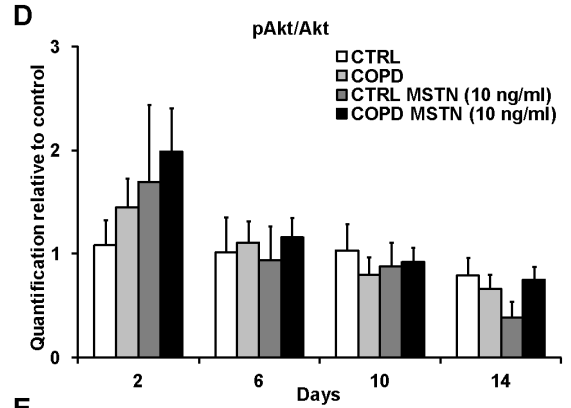
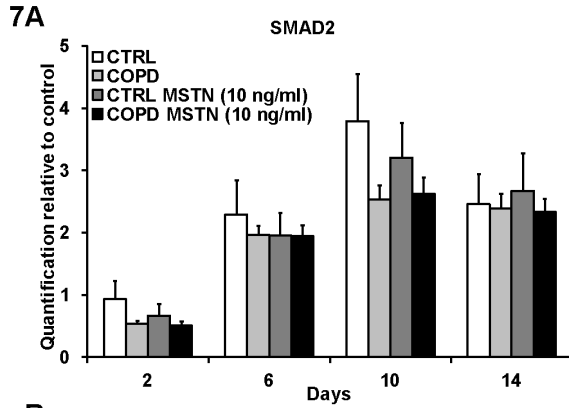












## **CHAPITRE VI**

# **COMPARATIVE ASSESSMENTS OF THE REGENERATIVE ACTIVITY IN PERIPHERAL AND RESPIRATORY SKELETAL MUSCLE OF PATIENTS WITH COPD**

Article en préparation pour

*Thorax*

# Chapitre 6: Comparative assessments of the regenerative activity in peripheral and respiratory skeletal muscle of patient with COPD.

## 6.1 Mise en contexte et contribution des auteurs

### Mise en contexte :

La dysfonction musculaire associée à la MPOC affecte différemment les muscles périphériques des muscles respiratoires. La maladie pulmonaire augmente la charge de travail des muscles impliqués dans la respiration alors que la spirale de déconditionnement diminue la demande des muscles périphériques. La comparaison entre ces deux groupes musculaires chez un même patient devient donc très intéressante. Plus spécifiquement, nous avons voulu comparer l'implication des cellules satellites dans l'adaptation du diaphragme et du quadriceps soumis à des niveaux d'activité opposés. Nous avons également voulu étudier si les cellules satellites étaient aptes à s'activer, à proliférer et à se différencier normalement autant dans le diaphragme que dans le *vastus lateralis*. De plus, nous avons voulu étudier si les  $\beta$ 2-agonistes, des molécules dynamogènes largement utilisées dans le traitement de la MPOC pouvaient avoir un impact sur les cellules satellites. Deux approches, *in vivo* et *in vitro*, ont été utilisées pour vérifier nos hypothèses.

### Contribution des auteurs :

MET a participé au design de l'étude, effectué les manipulations en laboratoire, amassé les données, analysé tous les résultats et rédigé la version initiale de l'article. AD, MEP a participé au design de l'étude, a amassé des données et supervisé le déroulement et l'écriture du manuscrit.

FM et RD ont participé au design de l'étude et ont supervisé le déroulement et l'écriture du manuscrit.

## 6.2 Résumé

**INTRODUCTION:** La Maladie Pulmonaire Obstructive Chronique (MPOC) est souvent associée à une atrophie musculaire périphérique diminuant la qualité de vie et la capacité fonctionnelle des patients atteints. La comparaison entre deux muscles ayant des degrés d'activation différents chez un même individu devient intéressante afin d'évaluer l'impact de facteurs locaux et/ou systémiques sur la capacité de régénération musculaire. Une altération au niveau de la régénération musculaire pourrait contribuer à la progression de la dysfonction musculaire associée à la MPOC.

**MÉTHODES:** Des biopsies du diaphragme et du quadriceps ont été obtenues chez onze patients ayant une MPOC et chez neuf sujets ayant une fonction pulmonaire normale. Le nombre de cellules satellites et de noyaux centraux ont été mesuré par immunofluorescence. L'expression en ARNm des facteurs régulant la myogenèse, la myostatine et l'ubiquitine protéasome ont été quantifiés par PCR en temps réel. À partir des biopsies, des cellules musculaires ont été isolées afin de mesurer leurs potentiels de prolifération et de différenciation en quantifiant l'accumulation des facteurs régulant la myogenèse avec ou sans la présence du clenbuterol, un  $\beta$ 2-agoniste.

**RÉSULTATS:** Le nombre de cellules satellites est similaire entre les groupes et entre les muscles étudiés. La proportion de noyaux centraux est augmentée dans le diaphragme et le quadriceps des patients ayant une MPOC. Une augmentation de l'expression en ARNm de MyoD, Myf5, Myogenin, MRF4, Numb, Follistatin, p21 et IL-6 a été observée dans le diaphragme des patients ayant une MPOC comparativement aux sujets contrôles. De plus, une diminution de l'expression de la myostatine et de la chaîne lourde de myosine a été observée dans le diaphragme des patients ayant une MPOC. Dans les quadriceps, l'expression en ARNm d'atrogin et de MuRF est augmentée autant chez les patients ayant une MPOC que chez les sujets contrôles. Le clenbuterol affecte négativement la prolifération des cellules musculaires indépendamment de la maladie pulmonaire.

**CONCLUSIONS:** Ces résultats indiquent que la régénération musculaire est accentuée dans le diaphragme des patients ayant une MPOC mais est similaire dans le quadriceps des deux groupes à l'étude. L'augmentation de l'activité des cellules satellites dans le diaphragme pourrait conduire à une sénescence répliquative prématurée et ainsi compromettre le maintien de la masse musculaire chez les patients ayant une MPOC.



### 6.3 Page titre

#### **Comparative assessment of the regenerative activity in peripheral and respiratory skeletal muscles of patients with COPD.**

Marie-Eve Thériault<sup>1</sup>, Marie-Ève Paré<sup>1</sup>, Annie Dubé<sup>1</sup>, François Maltais<sup>1</sup>,  
Richard Debigaré<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Centre de recherche Institut universitaire de cardiologie et de pneumologie de Québec, Université Laval, G1V 4G5

\*Corresponding author

#### **Author's contribution:**

**Marie-Eve Thériault:** Conception, data acquisition and analysis, drafting and reviewing the manuscript.

**Marie-Ève Paré;** Conception, data acquisition and final approval of the manuscript.

**Annie Dubé;** Conception, data acquisition and final approval of the manuscript.

**François Maltais;** Conception, data acquisition and final approval of the manuscript.

**Richard Debigaré;** Conception, data analysis and final approval of the manuscript.

**Corresponding Author:** Richard Debigaré, PT, PhD

Tel. (418) 656-8711 ext 2696

Richard.Debigare@rea.ulaval.ca

## 6.4 Abstract

**RATIONALE:** Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD) is often associated with limb muscle atrophy, which decreases quality of life and functional capacity in affected individuals. Comparing the signalisation involved in the skeletal muscle regeneration between two muscles with different levels of activation within the same subjects is an interesting strategy to evaluate the impact of local versus systemic factors in the regulation of skeletal muscle regeneration. Impaired satellite cell activation, proliferation and differentiation affecting skeletal muscle regeneration could contribute to the progression of muscle dysfunction in patients with COPD.

**METHODS:** Diaphragm biopsies were obtained during thoracic surgery and quadriceps samples were obtained from needle biopsies in eleven patients with COPD and nine patients with normal lung function. Satellite cell number and central nuclei were assessed on cryosections by nuclear immunostaining. Myogenesis-related, Myostatin-related and ubiquitin-proteasome-related mRNA were quantified by real-time PCR. In vitro primary muscle cell cultures were performed from muscle biopsy specimens to measure satellite cell proliferation rates and to assess commitment to differentiation by measuring the accumulation of Myogenic Regulatory Factors (MRFs) with or without a  $\beta$ 2-adrenergic drug, clenbuterol.

**RESULTS:** Although satellite cell numbers in muscle samples were similar between groups, the proportion of muscle fibers with central nuclei was increased in patients with COPD in both muscle groups. In muscle homogenates, increased expression of the MRFs (MyoD, Myf5, Myogenin, MRF4), Numb, Follistatin, p21, IL-6 and decreased expression of Myostatin and embryonic Myosin Heavy Chain was observed in the diaphragm of patients with COPD. In the quadriceps, mRNA expression of Atrogin and MuRF was increased in patients with COPD and in controls. In cultured muscles cells, clenbuterol has a slight negative effect on proliferation in a

similar extent between muscles and groups while it did not decrease the accumulation of the MRFs.

**CONCLUSIONS:** These results indicate that skeletal muscle regeneration is accentuated in the diaphragm and similar in the quadriceps of patients with COPD compared to controls. At the end, the increase regenerative activity in the muscle could exhaust satellite cells, compromising the maintenance of muscle mass in patients with COPD.

## 6.5 Introduction

Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is considered a systemic disease (1) with not only consequences on respiratory muscle but also on limb muscles (reviewed in Caron et al. (2)). Considerable literature demonstrates that both structural and functional changes are reported in these muscle groups. For instance, limb skeletal muscle atrophy (3), decreased quality of life (4) and premature death (5) are frequently observed in limb muscles of patients with COPD. Tissue modifications are also found in inspiratory muscles, which are associated with dyspnea, hypercapnic respiratory failure and premature death (6). Peripheral and respiratory muscles are demonstrating distinct adaptations in the context of COPD (7). An impaired capacity for muscle regeneration has been hypothesized to take part in this process in lower limb (8). However, no studies have yet investigated the integrity of muscle regeneration in the diaphragm of patients with COPD.

Many biochemical mechanisms have been proposed to initiate and to promote the development of skeletal muscle dysfunction in patients with COPD (9). The degree of muscle activation as a cause of muscle dysfunction and wasting is relevant in COPD. Chronic inactivity reduces the degree of quadriceps activation, even early in the disease, and has been proven to initiate structural and functional muscle changes (10). Changes observed in the limb muscle of patients with COPD include a reduction in proportion of type I fiber, in oxidative enzyme capacity, in muscle cross-sectional area, in antioxidant enzyme levels and in capillarization (11). While the increased work of breathing results in a chronically activated diaphragm (2). Change occurring in the diaphragm include increase in proportion of type I fiber, in capillarization, in oxidative enzyme capacity and in antioxidant enzyme levels (2). According to recent data (12), susceptibility to muscle atrophy seems to be greater in the *vastus lateralis* compared to the diaphragm in patients with COPD (8). Therefore, expositions to local or systemic factors are different between the *vastus lateralis* and the diaphragm (2). We previously

demonstrated that the regenerative potential has been exhausted in the limb muscle of patients with COPD (8). Satellite cells and regenerative activity in the diaphragm of patients with COPD is currently unknown as well as their contribution to muscles adaptations occurring with the disease.

Appropriate activation of satellite cells after damage is essential for the proper regeneration of muscle tissue and could contribute to the development of muscle dysfunction observed in patients with COPD (13). In the activated state, satellite cells will first enter the cell cycle through the expression of myogenic regulatory factors (MRF) such as MyoD and Myf5 (14). Eventually, newly formed myoblasts will exit the cell cycle and differentiate into myotubes and express myogenin and MRF4. Fully differentiated myotubes will fuse to injured myofibers for repair or fuse together to form a new one (15). Newly formed myofibers will exhibit a central nuclei (16). To preserve an adequate population of muscle satellite cells during adulthood, some newly formed myoblasts will return to the quiescent state (17;18).

Over the progression of the lung affection, patients with COPD are experiencing muscle atrophy. Proper muscle regeneration machinery is essential to restore and to preserve muscle tissue after damage (19). In parallel,  $\beta$ 2-adrenergic drugs are commonly used in COPD and recent studies have suggested that  $\beta$ 2-adrenoreceptors could play a role in muscle regeneration (20). Other than their bronchodilatory and non-bronchodilatory effects (21), long term beneficial effects on health status (22;23) could be explained by their impact on muscle functions (24). Activation of these receptors is known to induce muscle hypertrophy through two main mechanisms: inhibition of proteolytic pathways (25) and increase of protein synthesis (26). Recently, exciting data has suggested a role for these receptors in regenerating muscles since  $\beta$ 2-adrenoreceptors density increased 2-3 fold after induction of myotoxic damage (27) but evidence supporting its relevance in human muscle tissue is missing.

Muscle mass maintenance relies on the delicate regulation between protein degradation, synthesis and the addition of new myonuclei from satellite cells. We hypothesized that the regenerative process is impaired in patients with COPD impeding muscle mass maintenance in both lower limb and respiratory muscles. To do so, we first measured in muscle biopsies (quadriceps and diaphragm) the number of satellite cells, the occurrence of central nuclei and the expression pattern of myogenesis-related, myostatin-related and ubiquitin-proteasome-related mRNA. Secondly, we characterized satellite cell activity using primary muscle cell culture to assess their capacity to proliferate and differentiate into myotubes with or without a  $\beta$ 2-adrenergic drug, clenbuterol. Better knowledge of the regenerative capacity in the context of COPD will enhance the understanding of the atrophying process and deepen the reasoning on training interventions in this population.

## **6.6 Materiel and Methods**

### **Subjects**

Eleven patients with COPD undergoing lung resection were recruited. Nutritional status was evaluated with anthropometric parameters at the time of the investigation. Patients with body weight loss over 10% during the last year that could be ascribed to cancer were excluded. Patients had not been exposed to systemic corticosteroids during the 2 months preceding their participation in the study and none were receiving long-term oxygen therapy. Nine subjects with normal lung function were also recruited in whom the same inclusion/exclusion criteria used in patients with COPD were applied except for lung function.

### **Pulmonary function, anthropometric measurements and body composition**

Standard pulmonary function tests including spirometry, lung volumes, and carbon dioxide diffusion capacity were obtained in all subjects during the initial evaluation according to previously described guidelines (28). Results were related to previously published normal values (29). Height and weight were measured according to standardized methods (30).

### **Muscle biopsy**

#### *Diaphragm*

Diaphragm biopsies were obtained during a thoracic surgical procedure (thoracoscopy or thoracotomy). Either the right or the left diaphragm was biopsied, depending on the side of the surgery. Muscle samples were taken from the costal median region of the diaphragm. Muscle specimens were divided in two parts. One was frozen in liquid nitrogen and stored at - 80°C for future analysis. The second part was placed in a sterile plate filled with phosphate-buffered saline (PBS), covered and transported on ice under sterile cell culture hood.

## *Quadriceps*

One needle biopsy of the *vastus lateralis*, performed as described by Bergström and routinely done in the laboratory, (31) was obtained in each participant. Muscle specimens were divided in two parts and proceed as described for the diaphragm.

### **Immunofluorescence**

Muscle section (10 µm) were fixed with ice-cold acetone and methanol 60/40 (v/v) at – 20°C for 20 minutes, washed with PBS, incubated with a blocking solution (horse serum 1%) for 1 hour and then incubated with the primary antibody overnight at 4°C in a humidified chamber. The primary antibody Pax7 (R&D Systems, Minneapolis, NE, USA) and laminin (DAKO, Glostrup, Denmark) excesses were cleaned with PBS, incubated with their specific secondary antibodies, a goat anti-mouse Alexa Fluor® 488 (R&D Systems) and a goat anti-rabbit Alexa Fluor® 546 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) for 1 hour, washed with PBS and then incubated with DAPI for 15 minutes. Slides were analyzed and images were captured using a Nikon Eclipse E600 microscope (Nikon Corporation). Immunofluorescence were performed in duplicate on two distinct muscle cryosections. To ensure maximal image quality, pictures were taken within 24 hours after labelling. All the muscle samples were labelled during the same experimentation.

### **Satellite cells and myonuclei labeling**

To assess the number of satellite cells in muscle tissue, immunofluorescence against the transcription factor Pax7 was used (32). Laminin was used to delineate muscle fibres. Nuclei were labeled using DAPI. Nuclei located deep to the basal lamina and positive for Pax7 was counted as satellite cells. The numbers of satellite cells was counted over 100 myofibres and reported as the number of satellite cells per 100 myofibres.



The presence of central nuclei was interpreted as a regenerative event since myonuclei incorporation is a specific step of muscle repair and satellite cells are responsible for 99% of muscle regeneration (33). A central nucleus was defined as a committed cell being located inside the perimeter of the fibre delimited by laminin. Number of central nuclei per 100 myofibres is reported.

### **Real-Time PCR**

Total RNA extraction was performed on 15 mg of muscle using a commercially available preparation (TRIzol<sup>®</sup> Reagent, Invitrogen, Burlington, Ontario, Canada). One µg of RNA was reverse transcribed to cDNA using Quantitect<sup>™</sup> Reverse Transcription Kit (Qiagen, Mississauga, Ontario, Canada). Real time PCR were performed in a Rotor-Gene<sup>™</sup> 6000 (Corbett Life Science, San Francisco, CA, USA) using Quantitect<sup>™</sup> SYBR<sup>®</sup> Green PCR Kit (Qiagen, Mississauga, Ontario, Canada). The comparative threshold cycles ( $\Delta$ CT) values for Notch, Numb, Pax7, MyoD, Myf5, Myogenin, MRF4, Wnt, Myostatin, Follistatn, Act11RB, eMHC, Atrogin, MuRF, SAA1, p21, TNF and IL-6 were normalized for RPLPO and 18s human reference genes and analyzed using the 2- $\Delta$ Ct method (34). All RT-PCR assays were performed in duplicate to ensure quantitative accuracy.

### **Satellite cells isolation and culture.**

Muscle samples were minced into a slurry using a scalpel and subjected to enzymatic digestion for 1h with 0,1% collagenase (Cedarlane, Hornby, ON, Canada) and 0,1% dispase (Invitrogen Corporation) at 37°C with gentle agitation. The digested muscle specimens were then dissociated by triturating several times and filtered through a 100µm filter (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA). Cells were plated and grown on collagen coated dishes (Sigma-Aldrich) in growth medium made of Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) with 1% glucose (HyClone, Logan, UT, USA) supplemented with 20% fetal bovine serum, penicillin 50 U/ml, streptomycin

50 µg/ml (HyClone) and 5ng/ml bFGF (Promega, Madison, WI, USA) in a humidified 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator. The medium was changed every two days and the cultures examined by inverted-phase microscopy. When cultured cells reached a confluence of 70% they were dissociated enzymatically with trypsin (Gibco, Carlsbad, CA, USA) and seeded for immediate propagation, or frozen into medium containing 10% DMSO for later use. To induce differentiation into myotubes, near to confluence myoblasts were placed in differentiation medium made of DMEM with 1% glucose and supplemented with 2% horse serum (HS), penicillin 50 U/ml, and streptomycin 50 µg/ml (HyClone). Differentiation medium was replaced every day for 8 consecutive days.

### **Proliferation assay**

After the first passage, satellite cells were plated at a density of  $5 \times 10^4$  cells in a 60mm cultures dish. Every 24h, cells were trypsinized and counted using a hemacytometer during four successive days. Clenbuterol, a  $\beta$ 2-agonist were added at a concentration of 10µM and 100µM every day to measured their impact on satellite cells proliferation.

### **Myogenesis assay**

To measure progression through myogenesis and differentiation,  $2 \times 10^5$  cells were placed in a 100 mm dish after their second passage. Myoblasts proliferated during six days before inducing differentiation for another eight days. Cells were allowed 48 hours to settle and adhere before adding the  $\beta$ 2-agonist, clenbuterol, every 48 hours at a concentration of 10µM. Whole cell lysates were performed every 96 hours until complete differentiation for a total of fourteen days in culture.

### **Western Blotting**

Western blotting was performed using a standard SDS-PAGE procedure by loading 20 µg of whole cell extracts. Proteins of interest were

detected using infrared-coupled secondary antibodies (#926-32211 and #926-32220, 1:20 000, Mandel Scientific, Guelph, Ontario, Canada). The antigen-antibody complexes were revealed using an Odyssey<sup>®</sup> infrared imaging system (LI-COR, Lincoln, Nebraska, USA). Western blotting against MyoD, Myf5, Myogenin and MRF4 (Santa Cruz) was performed to quantify protein accumulation in cultured satellite cells.

### **Statistical analysis**

Results are expressed as mean ( $\pm$  SEM). Data from patients with COPD and controls were analyzed using a one-way analysis of variance (ANOVA). Differences were considered to be significant when  $p < 0.05$ .

## 6.7 Results

### Subject's characteristics

Anthropometric characteristics and pulmonary function data are provided in Table 1. Patients with COPD and controls did not significantly differ regarding age and body mass index. Patients with COPD had a lower body mass index (BMI) compared to controls. On average, patients had mild-to-severe airflow obstruction: six patients had stage I, two patients had stage II and three patients had stage III disease according to the GOLD classification (35). All study subjects were suspected of having a resectable lung cancer. On final analysis, 18 had lung cancer, 2 patients had a benign tumour and details on the final diagnosis are provided in Table 2.

### Muscle characteristics (in vivo)

#### *Satellite cells quantification*

Pax7 positive cells ratios did not differ between patients with COPD and controls and between muscle groups (Figure 1A). A representative *vastus lateralis* cryosections immunostained for Pax7 and laminin is depicted in Figure 1B.

#### *Central nucleus quantification*

The number of central nuclei per 100 muscle fibers is significantly higher in the diaphragm compared to the quadriceps in patients with COPD (2.2 fold;  $p < 0.05$ ) (figure 2A). In controls, the number of central nuclei is similar between muscle groups. The number of central nuclei is significantly higher in the diaphragm (3.6 fold;  $p < 0.01$ ) and in the quadriceps (1.6 fold;  $p < 0.05$ ) of patients with COPD compared to controls (figure 2A). A representative cryosection immunostained for nucleus and laminin is provided in Figure 2B.

#### *Myogenic regulatory factors expression*

Skeletal muscle regeneration is an ordered process in which satellite cells go through myogenesis to complete the differentiation under the control of Notch (proliferation) and Wnt (differentiation) and their effectors (MRFs). Myogenesis-related mRNA expression levels were analysed in the diaphragm and in the quadriceps of patients with COPD and controls. In patients with COPD, significant increased expression of Numb (6.4 fold;  $p < 0.05$ ), MyoD (2.8 fold;  $p < 0.05$ ), Myf5 (6.5 fold;  $p < 0.05$ ), Myogenin (6.5 fold;  $p < 0.05$ ) and MRF4 (4.9 fold;  $p < 0.05$ ) was observed in the diaphragm compared to the quadriceps (Figure 3B, 3D, 3E, 3F and 3G respectively). In controls, all values were similar between the diaphragm and the quadriceps. When comparing patients with COPD and controls, significant increased expression in the diaphragm of Numb (2.3 fold;  $p < 0.05$ ), MyoD (2.3 fold;  $p < 0.05$ ), Myogenin (1.9 fold;  $p < 0.05$ ) and MRF4 (2.8 fold;  $p < 0.05$ ) mRNA was observed (Figure 3B, 3D, 3F and 3G respectively).

Myostatin, a member of the Transforming Growth Factors beta (TGF- $\beta$ ) superfamily has been shown to inhibit satellite cells activity (36). Myostatin exerts its activity through the activin receptor type IIB (ActRIIB) on skeletal muscle while Follistatin is a potent antagonist having the ability to hinder access to the ActRIIB receptors. Myostatin-related mRNA expression levels were analysed in a similar way then previously stated. In patients with COPD, increased expression of Follistatin (3.6 fold;  $p < 0.05$ ) was observed in the diaphragm compared to the quadriceps (Figure 4B). In controls, significant increase expression of Myostatin (2.2 fold;  $p < 0.05$ ) and eMHC (32.8 fold;  $p < 0.05$ ) was observed in the diaphragm compared to the quadriceps (Figure 4A and 4D). Significant decrease expression of Myostatin (2.2 fold;  $p < 0.05$ ) and eMHC (3.2 fold;  $p < 0.05$ ) and significant increase expression of Follistatin (1.7 fold;  $p < 0.05$ ) in the diaphragm of patients with COPD was observed compared to controls (Figure 4A, 4D and 4B respectively).

Ubiquitin-mediated proteolysis was identified as a critical regulator of skeletal muscle atrophy in several animal models of disease mainly thought

the muscle specific E3-ligases, Atrogin and MuRF (37;38). Ubiquitin-proteasome-related mRNA expression were analysed in a similar way then previously stated. In patients with COPD, mRNA expression of Atrogin (1.9 fold  $p<0.05$ ), MuRF (3.3 fold  $p<0.05$ ) and SAA1 (19.7 fold  $p<0.05$ ) was significantly increased in the quadriceps while IL-6 (10.9 fold  $p<0.05$ ) was increased in the diaphragm (Figure 5A, 5B, 5C and 5F). In controls, mRNA expression of Atrogin (1.7 fold  $p<0.05$ ), MuRF (4.8 fold  $p<0.05$ ) and p21 (2.2 fold  $p<0.05$ ) was significantly increased in the quadriceps compared to the diaphragm (Figure 5A, 5B and 5D). Between patients with COPD and controls, increase expression of p21 (4.6 fold  $p<0.05$ ) and IL-6 (3.8 fold  $p<0.05$ ) was observed in the diaphragm (Figure 5C and 5F) while in the quadriceps, mRNA expression of SAA1 (27.0 fold  $p<0.05$ ) was also increased (Figure 5C).

### **Satellite cell characteristics (*in vitro*)**

To understand how the myogenic process is coordinated *in vitro*, cell proliferation was assessed and evaluated by counting growing cells every 24 hours over a 96-hour period. Proliferation rate in myoblasts of patients with COPD was similar compared to control at each time point in both muscles (Figure 6A and 6B). The accumulation of proliferating myoblasts was decreased in the diaphragm of patients with COPD at 24 hours with clenbuterol ( $p<0.05$ ) (Figure 6A). In the quadriceps, reduced accumulation of myoblasts was observed in patients with COPD at 72 hours.

Skeletal muscle myogenesis is an ordered process mainly regulated by the MRFs. Pax7 will transcribe MyoD and Myf5 during myoblast proliferation and then commit to the differentiation process, which is mainly control by myogenin and MRF4. There was no statistical difference in the accumulation of the four MRFs between groups and muscle groups during myogenesis

(Figure 7). Even with the addition of clenbuterol the accumulation of the four MRFs remain similar between groups.

## **6.8 Discussion**

One of the most striking consequences of COPD is the reduction of muscle mass resulting in loss of endurance and strength (39;40). Limb muscle dysfunction is associated with decrease exercise tolerance (41), quality of life (4) and survival (5). Inspiratory muscle dysfunction is associated with dyspnea, hypercapnic respiratory failure and premature mortality (6). This study provides a thorough investigation of the contribution of satellite cell activity involved in the regulation of muscle mass in patients with COPD. A major feature of this study was the opportunity to investigate the regenerative activity in two different muscles taken from the same individuals. As a static picture of the process, the first assessments were performed directly on muscle specimens using histological characterisation and mRNA content measurements. The number of satellite cells was similar between subjects and between muscles. However, evidence of increased regenerative events in the form of an increased number of central nuclei was found in patients with COPD compared to controls at a higher extent in the diaphragm. This statement is supported by the fact that MRFs mRNA expression are increased and paralleled by a decreased mRNA content of myostatin signalling in the diaphragm of patients with COPD. To further investigate the dynamic of the regenerative process, primary cell culture derived from muscle biopsies taken in patients with COPD and controls was used. Isolated satellite cells were cultured with or without a  $\beta$ 2-agonist, clenbuterol. It was found that satellite cells isolated from patients with COPD without clenbuterol have a similar response compared to those isolated from controls in both muscles groups. Clenbuterol appear to decrease the proliferative potential as the dose increase particularly in satellite cells isolated from patients with COPD.

### **Myogenic characteristics of the muscle tissue**

#### *Satellite cell number*



In order to sustain an appropriate regenerative function and thus to be able to support muscle fiber repair, satellite cell population must remain constant during lifespan. In this study, the density of satellite cells was similar in patients with COPD and controls. This observation was maintained even when we compared the diaphragm to the quadriceps. We and others reported similar results in a distinct population of patients with COPD (8;42). Together, these results demonstrate that satellite cell number is maintained in patients with COPD and suggests that chronic lung disease does not have a significant impact on the decline in satellite cell (42). Even if the number of satellite cells between muscle and groups are similar, impair regenerative process in skeletal muscle of patients with COPD is still likely.

#### *Central nuclei and regenerative events*

Upon activation, satellite cells will multiply and commit their development into myoblasts (16). The capacity of myoblasts to differentiate into myotubes and form new myofibers is the last critical step for muscle regeneration (16). The number of central myonuclei is an indication of committed satellite cells into the repair process (15;43;44). As previously reported, we found a higher ratio of central nuclei in patients with COPD when compared to controls (8). The diaphragm follows a similar pattern between group with increase number in this particular muscle, which suggests an increased number of regenerative events in respiratory muscle and in patients with COPD. This observation demonstrates that satellite cells can be activated in patients with COPD and also supports the hypothesis that muscle tissue might be more exposed to injury sometimes during the progression of the disease (45-47).

#### *Expression of myogenic regulatory factors in muscle tissue*

Adult skeletal muscle fibers are multinucleated cells in which each myonucleus controls the production of mRNA over a finite volume of cytoplasm. To increase the volume of a single muscle fiber, the transcription

machinery has to increase the transcription of myogenic genes and protein synthesis. In patients with COPD, lower expression of embryonic/neonatal myosin heavy chains (eMHC) in the diaphragm of patients with COPD compared to controls has been shown (48). Furthermore, it has been suggested that the myotubes differentiation in the diaphragm is impaired (49). In this study, we have shown that in the diaphragm, several mRNA involved in myogenesis and myostatin signaling are significantly different in patients with COPD compared to controls. Overall, myogenesis-related mRNA tends to be upregulated and myostatin-related mRNA tends to be downregulated in patients with COPD. The last step of muscle regeneration is the formation of muscle fibers. These newly formed fibers will express eMHC, which is decrease in patients with COPD. A decreased accumulation of eMHC at the end of the regenerative process is suggestive of a defect during myogenesis.

In the quadriceps, mRNA values of the MRFs and myostatin signalling are similar between groups. Because the quadriceps biopsy occurs several hours after the thoracic surgery, we suspect the lack of modulation in MRFs and myostatin mRNA due to immobility. In fact, Atrogin and MuRF mRNA are both upregulated in the quadriceps, an observation compatible with disuse and inactivity (38). MRF's mRNA are highly sensitive, as such any kind of exercise can modulate their expression and they have a very rapid turnover. For example, MyoD mRNA expression in human *vastus lateralis* after resistance exercise starts to increase at 4 hours and is back to basal level after 8 hours (50). In most case, the biopsy was made at least 6 hours after entering the thoracic surgery room with minimal daily task before the surgery. Only Serum amyloid A-1 (SAA1), an acute phase protein (51) and p21 mRNA, a cyclin-dependant kinase (cdk) inhibitors are modulated in the quadriceps of patients with COPD. Because of its ubiquitous presence in inflammatory diseases (52) such as in COPD (53), SAA1 has been suggested to be a novel biomarker during acute exacerbations of COPD (53). Interestingly, its expression is increased by 27.0-fold in limb muscle, as previously reported in patients with stable COPD compared to controls (54).

In this study, we reported a 3.5-fold increase in the p21 mRNA expression in the in the *vastus lateralis* of patients with COPD compared to controls as previously observed (54). The role for this increase in SAA1 mRNA and p21 mRNA in patients with COPD is however unknown.

## **Myogenic characteristics of the muscles cells**

### *Expression of myogenic regulatory factors in satellite cells*

$\beta$ 2-adrenergic drugs are commonly used in COPD and recent studies have suggested that  $\beta$ 2-adrenoreceptors could play a role in muscle regeneration (56). Activation of these receptors is known to induce muscle hypertrophy through the dissociation of the heterotrimeric G-protein into Gas and G $\beta$  $\gamma$  subunits leading to two distinct responses: inhibition of proteolytic pathways (57) and increase of protein synthesis (58). We provided results suggesting that satellite cells proliferation is in fact negatively modulated by clenbuterol but myogenic regulatory factors are not regulated by this  $\beta$ 2-agonist. The hypertrophic effects of  $\beta$ 2-adrenergic drugs are more likely due to increase protein synthesis and decrease protein degradation of muscles fibers in contrast to the activation of satellite cells (59). In fact,  $\beta$ 2-adrenergic drugs have been shown to effectively restore muscle function after injury by increasing protein synthesis via the mammalian target of rapamycin (mTOR) signalling without increased activation of satellite cells (60). In the end,  $\beta$ 2-adrenergic drugs have therapeutic potential by promoting muscle hypertrophy and repair after injury but the activation of satellite cells is not required.

## **Summary and Conclusion**

We provide strong evidence of an increase regenerative activity and a lower myostatin signaling in the diaphragm of patients with COPD compared to controls. In the quadriceps, gene expression appears to be similar between patients with COPD and controls and could be the result of a decrease activity in this muscle before the thoracic surgery. We believe that muscle

regeneration work properly in patients with COPD because cultured satellite cells from muscle samples (diaphragm and quadriceps) have a similar activity compared to controls. Even if satellite cells appear to sustain the increased demand in muscle regeneration, in the end, this will result in an exhaustion of their potential and eventually cellular senescence. Better understanding of the biological behaviour of satellite cells in patients with COPD will be instrumental in designing pharmacological interventions aimed at maintaining muscle mass in this disease.

## **6.9 Acknowledgements**

The authors acknowledge the contribution of Marthe Bélanger, Marie-Josée Breton, Brigitte Jean, Josée Picard for their help in accomplishing this study.

## 6.10 References

- (1) Barnes PJ, Celli BR. Systemic manifestations and comorbidities of COPD. *Eur Respir J* 2009 May;33(5):1165-85.
- (2) Caron MA, Debigare R, Dekhuijzen PN, Maltais F. Comparative Assessment of the Quadriceps and the Diaphragm in Patients with COPD. *J Appl Physiol* 2009 Apr 9.
- (3) Debigare R, Marquis K, Cote CH, Tremblay RR, Michaud A, Leblanc P, et al. Catabolic/anabolic balance and muscle wasting in patients with COPD. *Chest* 2003 Jul;124(1):83-9.
- (4) Gosselink R, Troosters T, Decramer M. Peripheral muscle weakness contributes to exercise limitation in COPD. *Am J Respir Crit Care Med* 1996 Mar;153(3):976-80.
- (5) Marquis K, Debigare R, Lacasse Y, LeBlanc P, Jobin J, Carrier G, et al. Mid thigh muscle cross-sectional area is a better predictor of mortality than body mass index in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2002 Sep 15;166(6):809-13.
- (6) Begin P, Grassino A. Inspiratory muscle dysfunction and chronic hypercapnia in chronic obstructive pulmonary disease. *Am Rev Respir Dis* 1991 May;143(5 Pt 1):905-12.
- (7) Doucet M, Debigare R, Joannisse DR, Cote C, LeBlanc P, Gregoire J, et al. Adaptation of the diaphragm and the *vastus lateralis* in mild-to-moderate COPD. *Eur Respir J* 2004 Dec;24(6):971-9.
- (8) Theriault ME, Pare ME, Maltais F, Debigare R. Satellite Cells Senescence in Limb Muscle of Severe Patients with COPD. *PLoS ONE* 2012;7(6):e39124.

(9) Wust RC, Degens H. Factors contributing to muscle wasting and dysfunction in COPD patients. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis* 2007;2(3):289-300.

(10) Pitta F, Troosters T, Spruit MA, Decramer M, Gosselink R. Activity monitoring for assessment of physical activities in daily life in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Arch Phys Med Rehabil* 2005 Oct;86(10):1979-85.

(11) Franssen FM, Wouters EF, Schols AM. The contribution of starvation, deconditioning and ageing to the observed alterations in peripheral skeletal muscle in chronic organ diseases. *Clin Nutr* 2002 Feb;21(1):1-14.

(12) Doucet M, Dubé A, Joanisse DR, Debigare R, Michaud A, Pare ME, et al. Atrophy and hypertrophy signalling in the quadriceps and diaphragm of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. In press 2009.

(13) Zammit PS, Partridge TA, Yablonka-Reuveni Z. The skeletal muscle satellite cell: the stem cell that came in from the cold. *J Histochem Cytochem* 2006 Nov;54(11):1177-91.

(14) Hyatt JP, McCall GE, Kander EM, Zhong H, Roy RR, Huey KA. PAX3/7 expression coincides with MyoD during chronic skeletal muscle overload. *Muscle Nerve* 2008 Jul;38(1):861-6.

(15) Snow MH. An autoradiographic study of satellite cell differentiation into regenerating myotubes following transplantation of muscles in young rats. *Cell Tissue Res* 1978 Jan 31;186(3):535-40.

(16) Charge SB, Rudnicki MA. Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiol Rev* 2004 Jan;84(1):209-38.

(17) Zammit PS, Golding JP, Nagata Y, Hudon V, Partridge TA, Beauchamp JR. Muscle satellite cells adopt divergent fates: a mechanism for self-renewal? *J Cell Biol* 2004 Aug 2;166(3):347-57.

(18) Collins CA, Partridge TA. Self-renewal of the adult skeletal muscle satellite cell. *Cell Cycle* 2005 Oct;4(10):1338-41.

(19) Zammit PS, Partridge TA, Yablonka-Reuveni Z. The skeletal muscle satellite cell: the stem cell that came in from the cold. *J Histochem Cytochem* 2006 Nov;54(11):1177-91.

(20) Ryall JG, Church JE, Lynch GS. A novel role for beta-adrenoceptor signalling in skeletal muscle growth, development and regeneration. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2009 Sep 28.

(21) Johnson M, Rennard S. Alternative Mechanisms for Long-Acting  $\beta_2$ -Adrenergic Agonists in COPD\*. *Chest* 2001 Jul;120(1):258-70.

(22) Calverley P, Pauwels R, Vestbo Jr, Jones P, Pride N, Gulsvik A, et al. Combined salmeterol and fluticasone in the treatment of chronic obstructive pulmonary disease: a randomised controlled trial. *The Lancet* 2003 Feb 8;361(9356):449-56.

(23) Stockley RA, Chopra N, Rice L. Addition of salmeterol to existing treatment in patients with COPD: a 12 month study. *Thorax* 2006 Feb;61(2):122-8.

(24) Lynch GS, Ryall JG. Role of beta-Adrenoceptor Signaling in Skeletal Muscle: Implications for Muscle Wasting and Disease. *Physiol Rev* 2008 Apr 1;88(2):729-67.

(25) Goncalves DAP, Lira EC, Baviera AM, Cao P, Zanon NM, Arany Z, et al. Mechanisms Involved in 3',5'-Cyclic Adenosine Monophosphate-Mediated Inhibition of the Ubiquitin-Proteasome System in Skeletal Muscle. *Endocrinology* 2009 Dec 1;150(12):5395-404.



(26) Navegantes LC, Resano NMZ, Baviera AM, Migliorini RH, Kettelhut IC. Effect of sympathetic denervation on the rate of protein synthesis in rat skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2004 Apr 1;286(4):E642-E647.

(27) Beitzel F, Gregorevic P, Ryall JG, Plant DR, Sillence MN, Lynch GS. beta2-Adrenoceptor agonist fenoterol enhances functional repair of regenerating rat skeletal muscle after injury. *J Appl Physiol* 2004 Apr 1;96(4):1385-92.

(28) Standards for the diagnosis and care of patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and asthma. This official statement of the American Thoracic Society was adopted by the ATS Board of Directors, November 1986. *Am Rev Respir Dis* 1987 Jul;136(1):225-44.

(29) Quanjer PH, Tammeling GJ, Cotes JE, Pedersen OF, Peslin R, Yernault JC. Lung volumes and forced ventilatory flows. Report Working Party Standardization of Lung Function Tests, European Community for Steel and Coal. Official Statement of the European Respiratory Society. *Eur Respir J Suppl* 1993 Mar;16:5-40.

(30) Heymsfield SB, Matthews D. Body composition: research and clinical advances--1993 A.S.P.E.N. research workshop. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 1994 Mar;18(2):91-103.

(31) Doucet M, Russell AP, Leger B, Debigare R, Joanisse DR, Caron MA, et al. Muscle atrophy and hypertrophy signaling in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2007 Aug 1;176(3):261-9.

(32) Lindstrom M, Thornell LE. New multiple labelling method for improved satellite cell identification in human muscle: application to a cohort of power-lifters and sedentary men. *Histochem Cell Biol* 2009 May 31.

(33) Partridge TA. Cells that participate in regeneration of skeletal muscle. *Gene Ther* 2002 Jun;9(11):752-3.

(34) Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>(-Delta Delta C(T))</sup> Method. *Methods* 2001 Dec;25(4):402-8.

(35) Fabbri LM, Hurd SS. Global Strategy for the Diagnosis, Management and Prevention of COPD: 2003 update. *Eur Respir J* 2003 Jul;22(1):1-2.

(36) Lee SJ, McPherron AC. Regulation of myostatin activity and muscle growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001 Jul 31;98(16):9306-11.

(37) Lecker SH, Goldberg AL, Mitch WE. Protein degradation by the ubiquitin-proteasome pathway in normal and disease states. *J Am Soc Nephrol* 2006 Jul;17(7):1807-19.

(38) Sandri M, Sandri C, Gilbert A, Skurk C, Calabria E, Picard A, et al. Foxo transcription factors induce the atrophy-related ubiquitin ligase atrogin-1 and cause skeletal muscle atrophy. *Cell* 2004 Apr 30;117(3):399-412.

(39) Debigare R, Maltais F. The major limitation to exercise performance in COPD is lower limb muscle dysfunction. *J Appl Physiol* 2008 Aug;105(2):751-3.

(40) Bernard S, LeBlanc P, Whittom F, Carrier G, Jobin J, Belleau R, et al. Peripheral muscle weakness in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1998 Aug;158(2):629-34.

(41) Saey D, Debigare R, LeBlanc P, Mador MJ, Cote CH, Jobin J, et al. Contractile leg fatigue after cycle exercise: a factor limiting exercise in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2003 Aug 15;168(4):425-30.

(42) Eliason G, Abdel-Halim S, Arvidsson B, Kadi F, Piehl-Aulin K. Physical performance and muscular characteristics in different stages of COPD. *Scand J Med Sci Sports* 2009 Dec;19(6):865-70.

(43) Maier A, Gambke B, Pette D. Degeneration-regeneration as a mechanism contributing to the fast to slow conversion of chronically stimulated fast-twitch rabbit muscle. *Cell Tissue Res* 1986;244(3):635-43.

(44) Conboy IM, Conboy MJ, Wagers AJ, Girma ER, Weissman IL, Rando TA. Rejuvenation of aged progenitor cells by exposure to a young systemic environment. *Nature* 2005 Feb 17;433(7027):760-4.

(45) Moore BJ, Miller MJ, Feldman HA, Reid MB. Diaphragm atrophy and weakness in cortisone-treated rats. *J Appl Physiol* 1989 Dec;67(6):2420-6.

(46) Reid WD, MacGowan NA. Respiratory muscle injury in animal models and humans. *Mol Cell Biochem* 1998 Feb;179(1-2):63-80.

(47) Orozco-Levi M. Structure and function of the respiratory muscles in patients with COPD: impairment or adaptation? *Eur Respir J Suppl* 2003 Nov;46:41s-51s.

(48) Nguyen T, Shrager J, Kaiser L, Mei L, Daood M, Watchko J, et al. Developmental myosin heavy chains in the adult human diaphragm: coexpression patterns and effect of COPD. *J Appl Physiol* 2000 Apr;88(4):1446-56.

(49) Ottenheijm CA, Heunks LM, Dekhuijzen RP. Diaphragm adaptations in patients with COPD. *Respir Res* 2008;9:12.

(50) Legerlotz K, Smith HK. Role of MyoD in denervated, disused, and exercised muscle. *Muscle Nerve* 2008 Sep;38(3):1087-100.

(51) Urieli-Shoval S, Linke RP, Matzner Y. Expression and function of serum amyloid A, a major acute-phase protein, in normal and disease states. *Curr Opin Hematol* 2000 Jan;7(1):64-9.

(52) Urieli-Shoval S, Linke RP, Matzner Y. Expression and function of serum amyloid A, a major acute-phase protein, in normal and disease states. *Curr Opin Hematol* 2000 Jan;7(1):64-9.

(53) Bozinovski S, Hutchinson A, Thompson M, Macgregor L, Black J, Giannakis E, et al. Serum amyloid a is a biomarker of acute exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2008 Feb 1;177(3):269-78.

(54) Debigare R, Maltais F, Cote CH, Michaud A, Caron MA, Mofarrahi M, et al. Profiling of mRNA expression in quadriceps of patients with COPD and muscle wasting. *COPD* 2008 Apr;5(2):75-84.

(55) Harley CB, Villeponteau B. Telomeres and telomerase in aging and cancer. *Curr Opin Genet Dev* 1995 Apr;5(2):249-55.

(56) Ryall JG, Church JE, Lynch GS. A novel role for beta-adrenoceptor signalling in skeletal muscle growth, development and regeneration. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2009 Sep 28.

(57) Goncalves DAP, Lira EC, Baviera AM, Cao P, Zanon NM, Arany Z, et al. Mechanisms Involved in 3',5'-Cyclic Adenosine Monophosphate-Mediated Inhibition of the Ubiquitin-Proteasome System in Skeletal Muscle. *Endocrinology* 2009 Dec 1;150(12):5395-404.

(58) Navegantes LC, Resano NMZ, Baviera AM, Migliorini RH, Kettelhut IC. Effect of sympathetic denervation on the rate of protein synthesis in rat skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2004 Apr 1;286(4):E642-E647.

(59) Roberts P, McGeachie JK. The effects of clenbuterol on satellite cell activation and the regeneration of skeletal muscle: an autoradiographic and morphometric study of whole muscle transplants in mice. *J Anat* 1992 Feb;180 ( Pt 1):57-65.

(60) Conte TC, Silva LH, Silva MT, Hirabara SM, Oliveira AC, Curi R, et al. The beta2-adrenoceptor agonist formoterol improves structural and functional regenerative capacity of skeletal muscles from aged rat at the early stages of postinjury. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2012 May;67(5):443-55.

## 6.11 Tables

**Table 1: Subjects characteristics**

	<b>Controls</b> (n= 9)	<b>COPD</b> (n=11)
<b>Age (years)</b>	62 ± 2	66 ± 3
<b>BMI (kg/m<sup>2</sup>)</b>	29 ± 1	25 ± 1 <sup>†</sup>
<b>FEV<sub>1</sub>, L</b>	2.7 ± 0.3	2.0 ± 0.2 <sup>†</sup>
<b>FEV<sub>1</sub>, % predicted</b>	103 ± 5	76 ± 8 <sup>†</sup>
<b>FEV<sub>1</sub> / FVC, %</b>	79 ± 2	59 ± 3 <sup>†</sup>
<b>TLC, % predicted</b>	102 ± 3	115 ± 4 <sup>†</sup>
<b>RV, % predicted</b>	113 ± 8	148 ± 10 <sup>†</sup>
<b>DL<sub>CO</sub>, % predicted</b>	106 ± 8	89 ± 9
<b><u>Final diagnosis</u></b>		
<b>Non-small cell lung carcinoma</b>		
<b>Stage Ia</b>	0	3
<b>Stage Ib</b>	6	2
<b>Stage IIa</b>	2	5
<b>Stage IIb</b>	0	0
<b>Benign pulmonary nodule</b>	1	1

**Definition of abbreviations: BMI = Body mass index; FEV<sub>1</sub> = Forced expiratory volume in 1 second; TLC = total lung capacity; RV = Residual volume; DLCO = Diffusing capacity of carbon monoxide.**

## 6.12 Figure legends

**Figure 1:** A) Quadriceps and diaphragm muscle cryosections were immunostained for co-expression and localization of nuclear Paired box transcription factor 7 (green), DAPI (blue) and laminin (red). Labeled nuclei located deep to the basal lamina and positive for Pax7 were counted as satellite cells (white arrow). B) The number of satellite cells is expressed over 100 fibers and reported as a ratio (ANOVA;  $p < 0.05$ ). Ratios are calculated from 9 controls and 11 patients with COPD.

**Figure 2:** A) Cryosections were analyzed by immunostaining for nuclei (blue) and laminin (red). Immuno-detection is shown for 10 $\mu$ m skeletal muscle cryosections. The number of central nuclei (white arrows) is expressed over 100 fibers and reported as a ratio. B) The total numbers of central nuclei were quantified per 100 fibers for 9 controls and 11 patients with COPD. Nucleus inside the perimeter of a given fiber delimited by laminin was counted as a central nucleus, expressed over 100 fibers and reported as a ratio. Distinct letter represents a statistically significant difference (ANOVA;  $p < 0.05$ ).

**Figure 3:** Quadriceps and diaphragm mRNA expression of myogenesis-related genes A) Notch, B) Numb, C) Pax7, D) MyoD E) Myf5 F) Myogenin, F) MRF4 and G) Wnt in control (CTRL) and clinically stable patients with COPD (COPD).

**Figure 4:** Quadriceps and diaphragm mRNA expression of myostatin-related genes A) Myostatin, B) Follistatin, C) Act11RB and D) eMHC in control (CTRL) and clinically stable patients with COPD (COPD).

**Figure 5:** Quadriceps and diaphragm mRNA expression of Atrogenes and inflammatory cytokines A) Atrogin, B) MuRF, C) SAA1 D) p21 E) TNF and F) IL-6 in control (CTRL) and clinically stable patients with COPD (COPD).

**Figure 6:** Proliferative potential in satellite cells isolated and cultured from controls (n=9) without clenbuterol (white bars) or with clenbuterol (light grey)

and patients with COPD (n=11) without clenbuterol (dark grey bars) or with clenbuterol (black bars). Values are expressed as mean  $\pm$  SEM.

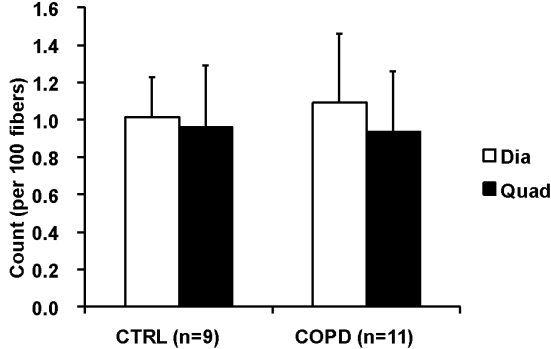
**Figure 7:** A) MyoD, B) Myf5, C) Myogenin D) MRF4 protein accumulation during myogenesis in satellite cells isolated and cultured from controls (n=9) without clenbuterol (white bars) or with clenbuterol (light grey) and patients with COPD (n=11) without clenbuterol (dark grey bars) or with clenbuterol (black bars). Protein extraction was performed every four days starting from day 2, the first six days during the myoblasts phase and the last eight days during the differentiation (day 6 to day 14). Clenbuterol were added every day at a concentration of 10  $\mu$ M.

\* represents a statistically significant difference ( $p < 0.05$ ).

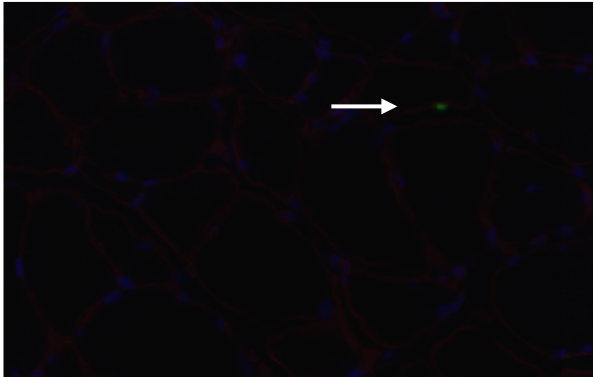


6.13 Figures

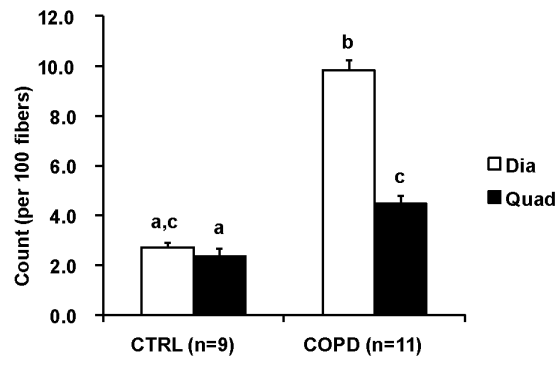
1A



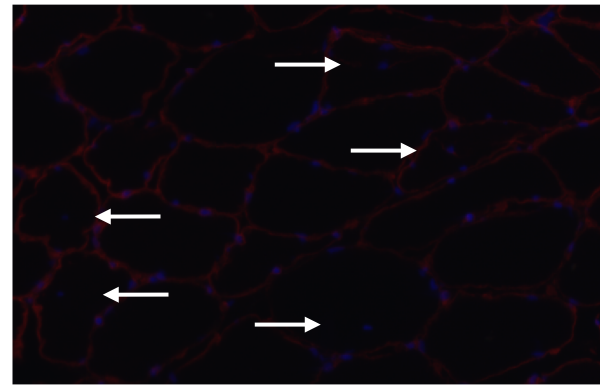
B

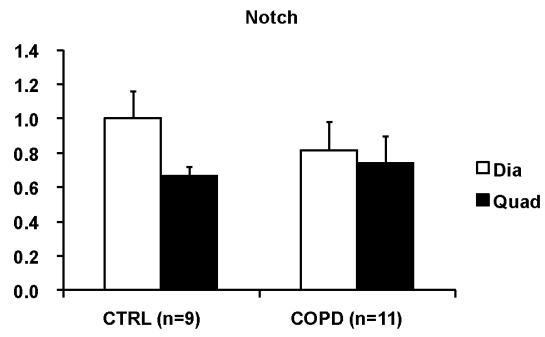
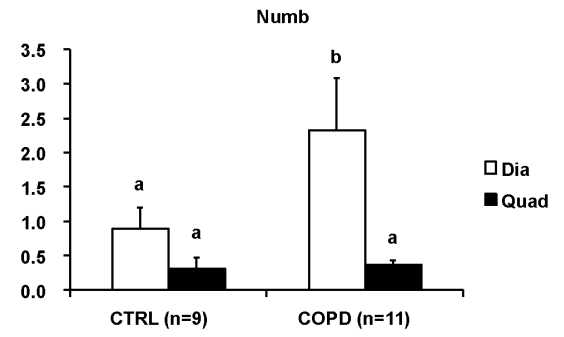
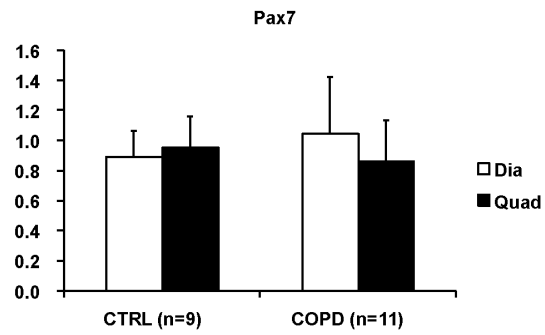
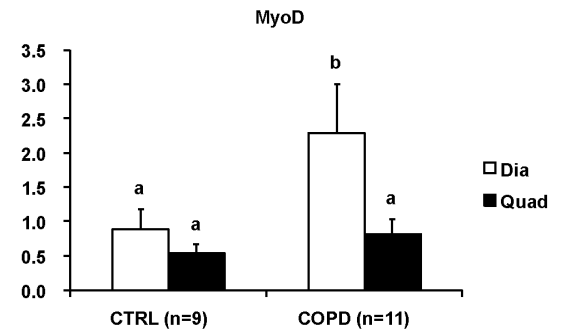
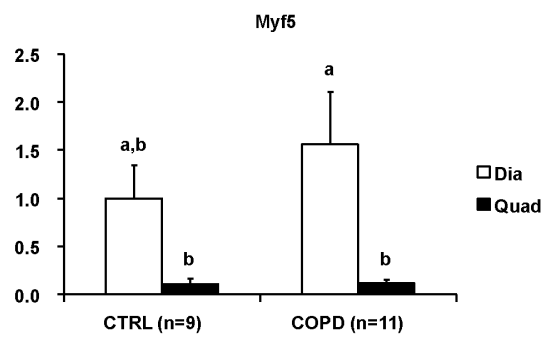
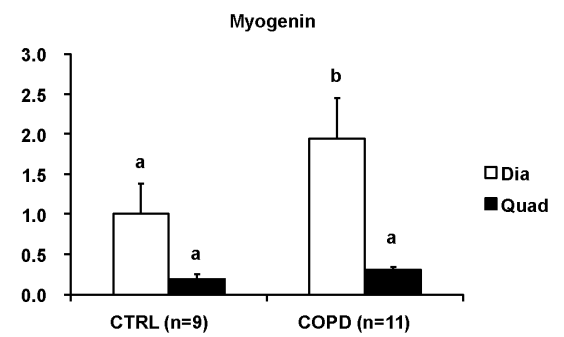
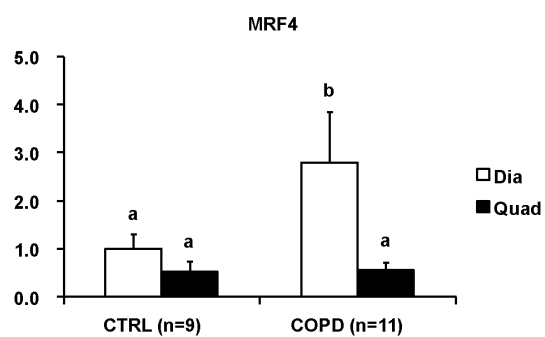
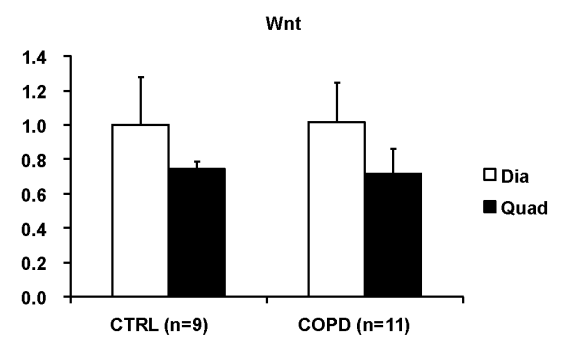


2A

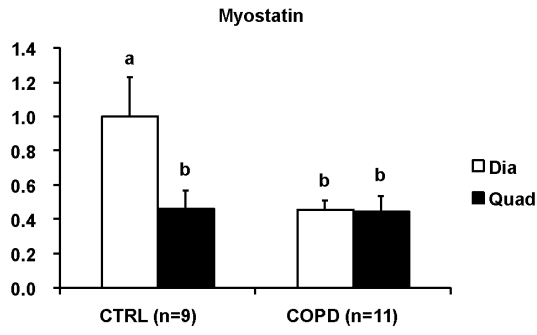


B

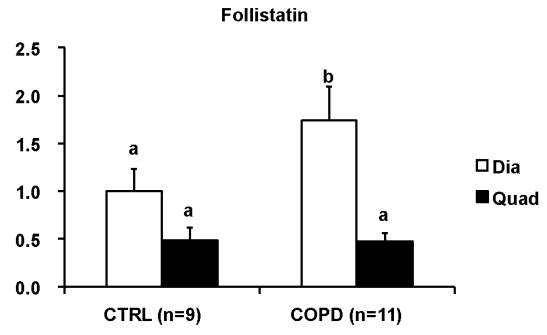


**3A****B****C****D****E****F****G****H**

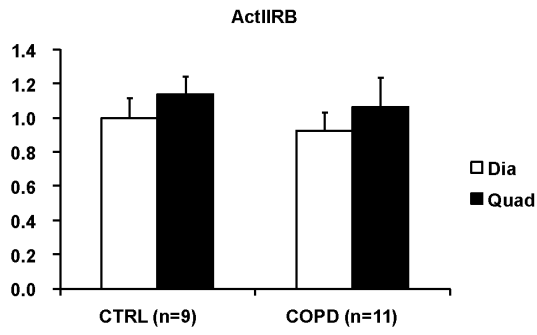
4A



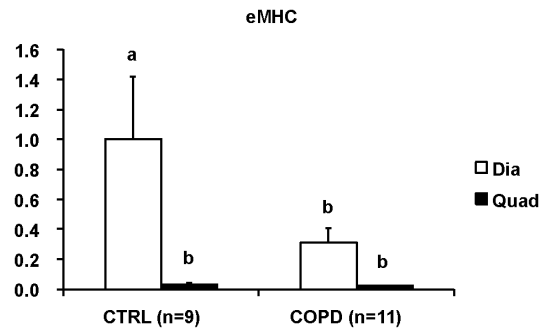
B



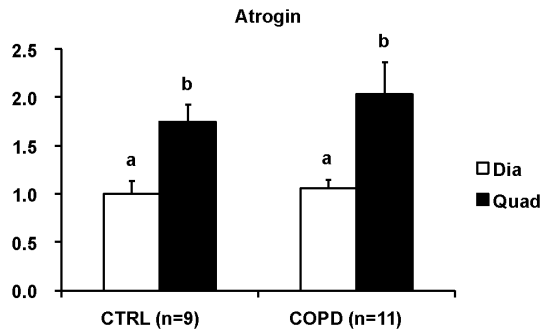
C



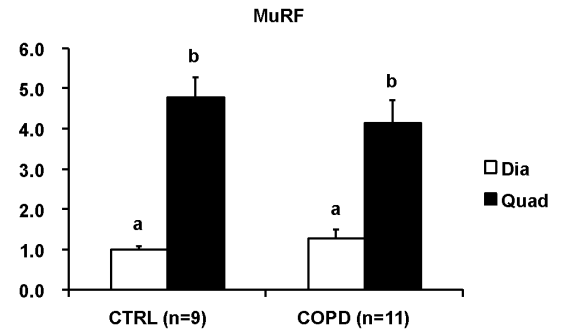
D



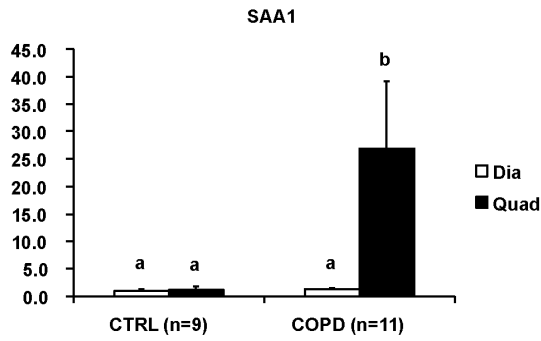
5A



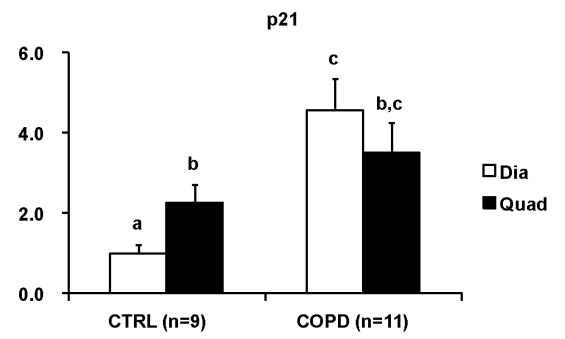
B



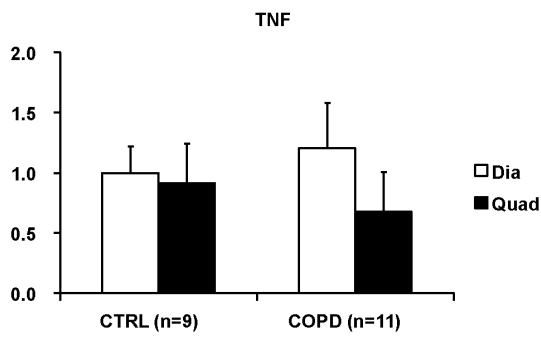
C



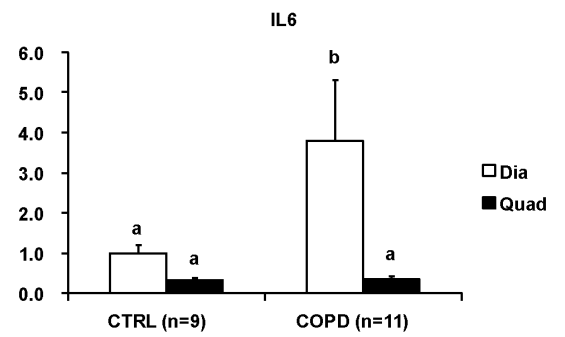
D



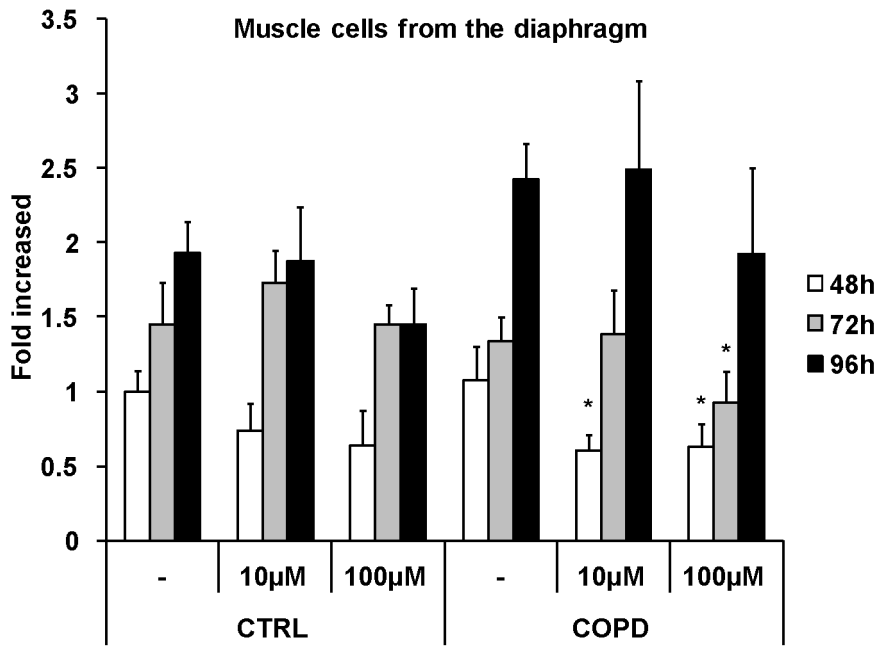
E



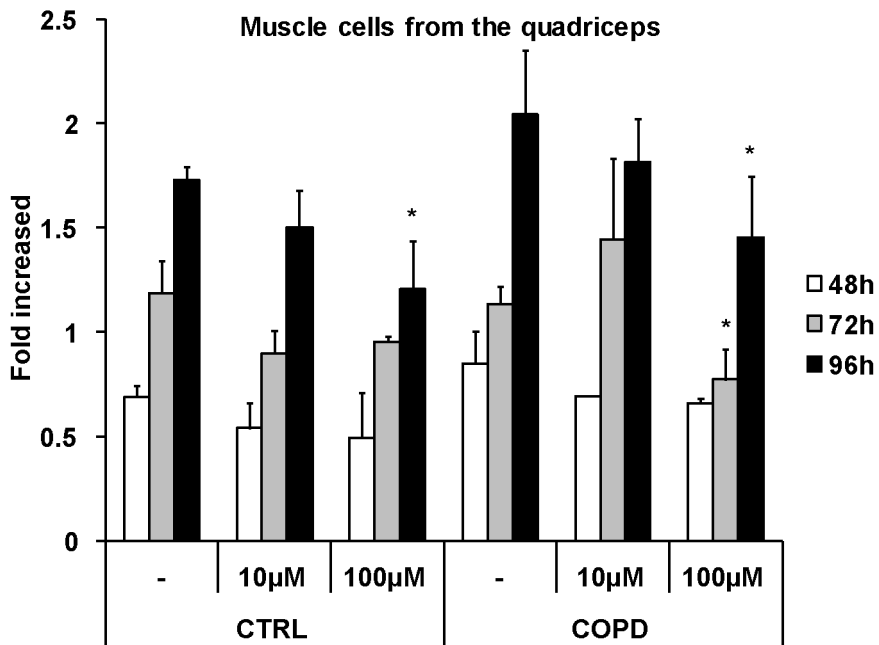
F

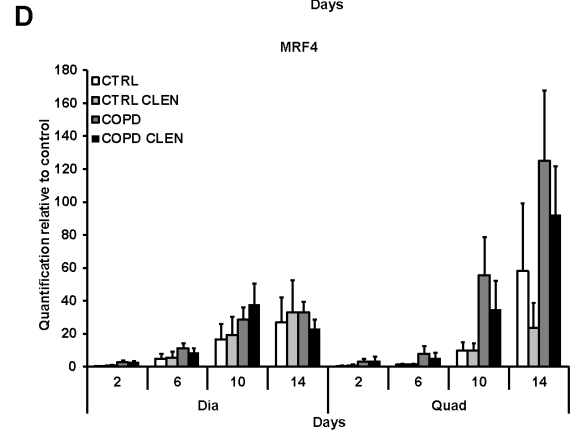
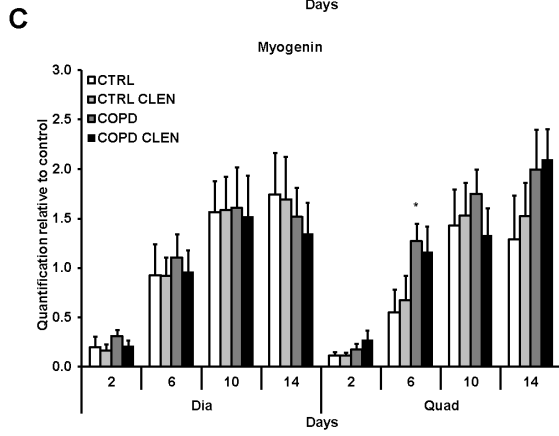
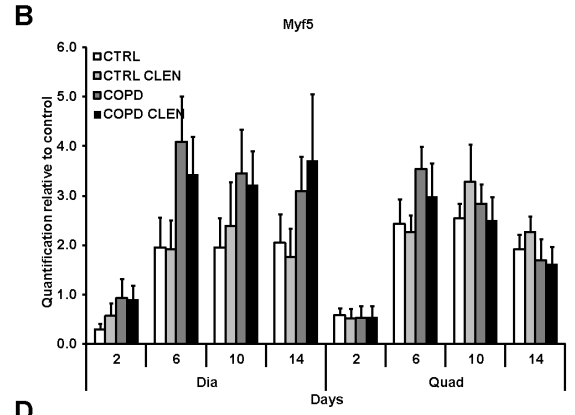
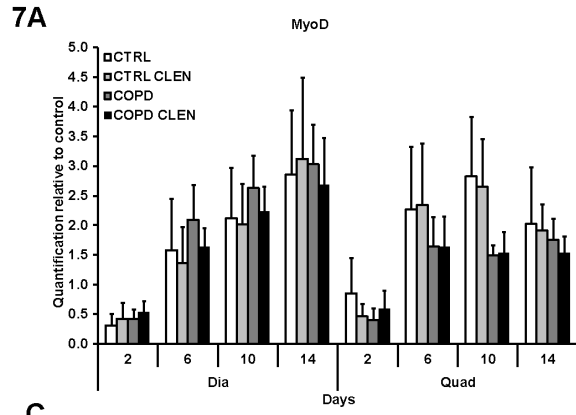


6A



B





## **CHAPITRE VII**

# **RELATIONSHIP BETWEEN THE INDUCTION OF SERUM AMYLOID A1 (SAA1) AND p21 IN COPD AND MUSCLE PROTEIN BREAKDOWN; A LINK WITH THE INFLAMMATORY RESPONSE?**

Article en préparation pour

*The American Journal of Respiratory Cells and Molecular Biology*



# Chapitre 7: Relationship between the induction of Serum amyloid A1 (SAA1) and p21 in COPD and muscle protein breakdown: a link with the inflammatory response?

## 7.1 Mise en contexte et contribution des auteurs

Il est bien admis que la MPOC augmente le niveau de stress inflammatoire au niveau pulmonaire tandis que la propagation de cette inflammation au reste de l'organisme n'a pas encore été démontrée. L'intérêt de démontrer ce phénomène réside dans le fait que l'inflammation en soi est capable d'induire la dégradation des protéines musculaires. Dans la dernière étude de cette thèse, nous avons voulu évaluer l'impact de l'environnement systémique sur l'homéostasie des protéines musculaire par l'étude de SAA1, une protéine de phase aiguë et de p21, une protéine du cycle cellulaire. Deux approches *in vivo* et *in vitro* ont été utilisées pour vérifier nos hypothèses.

### Contribution des auteurs :

MET a participé au design de l'étude, effectué les manipulations en laboratoire, amassé les données, analysé tous les résultats et rédigé la version initiale de l'article. BBL et AD ont participé au design de l'étude, ont amassé des données et supervisé le déroulement et l'écriture du manuscrit. FM et RD ont participé au design de l'étude et ont supervisé le déroulement et l'écriture du manuscrit.

## 7.2 Résumé

**INTRODUCTION:** Plusieurs études ont relié l'inflammation systémique avec les changements observés dans les muscles squelettiques des patients ayant une MPOC. La protéine de phase aiguë, Serum amyloid A1 (SAA1), est un marqueur des épisodes d'exacerbation chez les patients ayant une MPOC. Le rôle joué par cette protéine dans l'atrophie musculaire et durant les périodes d'exacerbation est toujours méconnu.

**MÉTHODES:** Des biopsies du *vastus lateralis* et des échantillons sanguins ont été prélevés chez des patients ayant une MPOC stable (n = 11) et en exacerbation (n=7) ainsi que chez des sujets contrôles (n = 10). La présence de cytokines inflammatoires dans le plasma (IL-6, IL-8, TNF, SAA1) et l'expression des ARNm de SAA1, p21, IL-6, TNF, Stat3 et Nedd4 dans les échantillons musculaires ont été mesurés. La dose effective de SAA1 et de LPS pour induire une altération de l'homéostasie des protéines musculaires a été déterminée avec une lignée de cellules musculaires provenant de souris (C2C12). Ensuite, des C2C12 ont été transfectés avec des siRNA de SAA1 et siRNA de p21 pour connaître leurs rôles respectifs en présence d'une inflammation (LPS). Dernièrement, l'effet de l'ajout de plasma des patients (MPOC stable et exacerbés) sur l'homéostasie des protéines musculaires a été évalué.

**RÉSULTATS :** Dans le plasma, le niveau de SAA1 est similaire entre les patients ayant une MPOC stable et les sujets contrôles, mais est augmenté chez les patients ayant une MPOC en exacerbation. Les niveaux en ARNm de SAA1 et p21 sont significativement augmentés dans le tissu musculaire des patients ayant une MPOC. De plus, SAA1 est capable d'induire la dégradation protéique en activant les E3-ligases et la réponse inflammatoire. L'absence des ARNm de SAA1 et p21 accentue la réponse inflammatoire dans les C2C12 en présence de LPS en plus d'induire les E3-ligases. L'ajout de plasma de patients ayant une MPOC sur les C2C12 augmente également l'expression en ARNm des cytokines inflammatoires et des E3-ligases.

**CONCLUSIONS:** SAA1 et p21 sont augmentés dans les muscles squelettiques des patients ayant une MPOC. SAA1 est capable d'induire la dégradation des protéines musculaires. Le plasma des patients ayant une MPOC est pour sa part capable d'induire l'expression des cytokines inflammatoire et des E3-ligases.

### 7.3 Page titre

#### **Relationship between the induction of Serum Amyloid A1 (SAA1) and p21 in COPD and muscle protein breakdown: a link with the inflammatory response?**

Marie-Eve Thériault<sup>1</sup>, Bruno B. Lemire<sup>1</sup>, Annie Dubé<sup>1</sup>, Fernanda Ribeiro<sup>1</sup>, Marie-Ève Paré<sup>1</sup>, François Maltais<sup>1</sup>, Richard Debigaré<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Centre de recherche Institut universitaire de cardiologie et de pneumologie de Québec, Université Laval, G1V 4G5, \*Corresponding author

#### **Author's contribution:**

**Marie-Eve Thériault:** Conception, data acquisition and analysis, drafting and reviewing the manuscript.

**Bruno B Lemire;** Conception, data acquisition and final approval of the manuscript.

**Annie Dubé;** Conception, data acquisition and final approval of the manuscript.

**Fernanda Ribeiro;** Conception, data acquisition and final approval of the manuscript.

**Marie-Eve Paré;** Conception, data acquisition and final approval of the manuscript.

**François Maltais;** Conception, data acquisition and final approval of the manuscript.

**Richard Debigaré;** Conception, data analysis and final approval of the manuscript.

**Corresponding Author:** Richard Debigaré, PT, PhD

Tel. (418) 656-8711 ext 2696

Richard.Debigare@rea.ulaval.ca

#### 7.4 Abstract

**RATIONALE:** Several reports have linked the systemic inflammation in patients with COPD with the changes observed in their skeletal muscles. Serum amyloid A1 (SAA1), an acute phase protein, has been suggested to be a novel biomarker of inflammation during acute exacerbations in patients with COPD. We investigated SAA1 expression in patients with COPD under stable condition and during an exacerbation of the disease as well as the role of SAA1 in the degradation of muscle protein.

**METHODS:** Biopsies of the *vastus lateralis* and blood samples were obtained from stable (n = 11) and exacerbated (n=7) patients with COPD and controls (n = 10). Analysis for plasma levels of inflammatory cytokines (IL-6, IL-8, TNF, SAA1) and mRNA expression of SAA1, p21, IL-6, TNF, Stat3 and Nedd4 from whole muscle extract was performed. Experiments with the mouse cells line C2C12 were then conducted to determine the effective dose of recombinant SAA1 and Lipopolysaccharides (LPS) to induce alteration in protein homeostasis. Then, force inhibition of SAA1 and p21 by siRNA was used on C2C12 in the presence of LPS to assess their role in the inflammatory response. Finally, the impacts of plasma on C2C12 protein homeostasis were quantified.

**RESULTS:** In plasma, SAA1 protein levels were not significantly different between stable patients with COPD and controls but exacerbated patients with COPD showed impressive elevated SAA1 plasma levels compared to controls. In muscle tissue, mRNA expression of SAA1 and p21 are significantly increased in patients with COPD. We also showed that recombinant SAA1 induce muscle protein breakdown by activating the E3-ligases and the inflammatory response. Moreover, the forced inhibition of SAA1 and p21 by siRNA seemed to exacerbate the inflammation in C2C12 myoblasts in the presence of LPS and induce E3-ligases mRNA. The addition of plasma from patients with COPD also increases the inflammatory cytokines mRNA and E3-ligases mRNA in C2C12 muscles cells.

**CONCLUSIONS:** SAA1 and p21 are both upregulated in skeletal muscle of patients with COPD. SAA1 can induce muscle protein breakdown. Moreover, the plasma of patients with COPD can induce several inflammatory cytokines and E3-ligases.

## 7.5 Introduction

Skeletal muscle atrophy is observed in a variety of acute and chronic conditions <sup>1-5</sup> including chronic obstructive pulmonary disease (COPD) <sup>6</sup>. In COPD, the unintentional loss of muscle mass has a significant impact on quality of life <sup>7</sup> and is associated with premature death <sup>8</sup>. Many biochemical factors have been proposed to initiate and promote the development of skeletal muscle atrophy in COPD <sup>9</sup>. As in other chronic inflammatory conditions, weight loss, muscle wasting, and tissue depletion are commonly seen in patients with COPD <sup>10</sup>. Although the inflammatory response has been linked to the initiation and development of muscle atrophy, discrepancies exist in the literature concerning the presence and the nature of systemic and/or local inflammatory response in COPD that could be linked to the skeletal muscle protein imbalance and ultimately atrophy <sup>11;12</sup>. In addition to the “spill-over” hypothesis <sup>13</sup>, there is no convincing nor consistent mechanisms linking the inflammatory response that take place into the lung and the development of local response such as in the muscles <sup>14-16</sup>. In line with these attractive speculations, the quest to identify a key inflammatory factor that could orchestrate the signaling cascade involved in contractile protein synthesis/degradation or even tissue renewal in peripheral muscles of patients with COPD is of major importance for future direction in this research field.

Serum amyloid A-1 (SAA1), an acute phase protein, is a multifunctional apolipoprotein that is involved in cholesterol transport and metabolism <sup>17</sup>. The exact role of SAA1 is still unknown but like other acute phase protein, SAA1 is thought to regulate numerous immunological responses <sup>18</sup>. SAA1 blood level increases dramatically (up to 1000-fold; 1 000 mg/mL) in response to various stimuli, which suggests an important short-term beneficial role in responses to tissue injury and inflammation <sup>19</sup>. Although the precise role of SAA1 in host defense during the inflammatory response has not been defined, significant functions have been proposed for SAA family members. These include induction of extracellular-matrix-

degrading enzymes and chemotactic recruitment of inflammatory cells to sites of inflammation. Because of its ubiquitous presence in inflammatory diseases<sup>20</sup> such as in COPD<sup>21</sup>, SAA1 has been suggested to be a novel biomarker during acute exacerbations of COPD<sup>21</sup>. In a distinct cohort, we reported a 21.2 fold increase in the SAA1 mRNA expression level in the *vastus lateralis* of patients with stable COPD compared to aged-matched controls<sup>22</sup>. Although the liver is the primary site of SAA1 synthesis, extrahepatic production has also been reported in a wide range of tissues including kidney, stomach, spleen, heart, brain and skeletal muscle<sup>23</sup>. Bacterial lipopolysaccharides and several cytokines (mainly IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF) are involved in the induction of SAA1 synthesis and its synergistic interaction with these cytokines<sup>24</sup> could contribute to the development of contractile protein degradation<sup>22</sup>.

Signal transducer and activator of transcription (STAT) family proteins are activated in response to extracellular signals such as cytokines, growth factors and hormonal factors<sup>25</sup>. IL-6 belongs to a family of cytokines that acts via the Janus Kinases (JAKs), which lead to the recruitment and action of Stat3<sup>26</sup> while Suppressors Of Cytokine Signaling 3 (SOCS3) are known to inhibit Stat3 activation. Stat3 mediates the expression of diverse genes that control critical cellular processes such as cell growth, apoptosis, inflammatory and immune responses<sup>27</sup>. It has also been demonstrated that Stat3 is the major transcription factor responsible for the up-regulation of SAA1 and c-reactive proteins (CRP) via the IL-6 transduction pathway during the inflammatory response<sup>28;29</sup>. Stat3 may act on the human SAA1 promoter region via the formation of a heteromeric complex containing Stat3, NF- $\kappa$ B p65, and p300 and that interaction contributes to the augmentation of SAA1<sup>30;31</sup>. On the other hand, there are evidence supporting the notion that p21, a cyclin-dependant kinase (cdk) inhibitors, could regulate the inflammatory response. Overexpression of p21 inhibits experimental arthritis development by decreasing pro-inflammatory molecule expression, including IL-1 $\beta$ , TNF, and IL-6 mRNA<sup>32</sup>. The relationship between SAA1 and p21 in the context of



inflammation in skeletal muscle is still speculative but p21 interacts with Stat3 and inhibits its transcriptional activity<sup>33</sup>. In the end, competition for Stat3 could attenuate the SAA1 response during the inflammatory response. Interestingly, we reported a 7.0 fold increase in the p21 mRNA expression level in skeletal muscle of patients with COPD compared to aged-matched controls<sup>22</sup>.

Ubiquitin-mediated proteolysis was identified as a critical regulator of skeletal muscle atrophy in several animal models of disease<sup>34</sup>. In the ubiquitination process, the coordinated action of several enzymes (E1, E2 and E3 ubiquitin ligases) covalently attaches a single or branched ubiquitin on a lysine residue of the target protein, which can serve as a marker for degradation by the 26S proteasome or the lysosome<sup>35</sup>. The E3-ligases are the key enzymes that confer specificity to the system by binding and linking ubiquitin to the protein<sup>35</sup>. Two muscle specific ubiquitin ligases, Atrogin and MuRF, are involved prominently in the development of skeletal muscle atrophy<sup>36</sup>. Both Atrogin and MuRF knockout mice are partially protected from the development of skeletal muscle atrophy pointing the existence of others E3-ligases<sup>37</sup>. For instance, Nedd4 induce muscle atrophy in the muscle of rodents subjected to unloading and denervation<sup>36;38</sup>. Interestingly, Nedd4 has been shown to be increased in the atrophic muscles of individuals with severe COPD<sup>39</sup>.

Both SAA1 and p21 are increased during the inflammatory response. Their concomitant expression might precede a cascade of events detrimental to skeletal muscle and because the nature of their potent interactions are unknown in that context, we wanted to 1) evaluate mRNA expression of SAA1 (plasma and quadriceps) and mRNA expression of p21 (quadriceps) in patients with COPD with either a stable condition or an acute exacerbation of their disease compared to a group of controls subjects and to 2) study the nature of the interactions between p21 and SAA1 and their impact on muscle cell homeostasis.

## 7.6 Materiel and Methods

### Subjects

Eighteen males with Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD) stage III and IV disease and ten controls with normal lung function were consecutively recruited for this study. In patients with COPD, only sedentary male ex-smokers who had stopped for at least 6 months were included in the present study in order to minimize heterogeneity in the measurements. COPD diagnosis was based on a past smoking history (> 10 pack-year) and pulmonary function test showing persistent airflow obstruction (forced expiratory volume in 1 s [FEV1] < 50% of predicted value and FEV1/forced vital capacity [FVC] < 70%)<sup>40</sup>. Eleven patients with COPD were in a stable condition at the time of their recruitment into the study while the remaining patients were recruited when an acute exacerbation of their disease was present. Recruitment of exacerbated patients was done inside a window of 24 to 48 hours maximum after their hospital admission to avoid any contamination with corticosteroids and antibiotics treatments. Exacerbation was defined by the ATS/ERS consensus criteria<sup>40</sup>. None of the patients was receiving long-term oxygen therapy. Patients with COPD and controls were excluded if they presented any medical condition likely to influence muscle and biochemical testing (i.e. cardiovascular, neurological, musculoskeletal, locomotor or other respiratory diseases). The institutional ethics committee approved the research protocol and a signed informed consent was obtained from each subject.

### Study design

After reviewing medical history and familiarization with the study procedures, anthropometric measurements, pulmonary function testing, mid-thigh muscle cross-sectional area and a body composition assessment were performed. After a 30 minutes resting in the supine position, subjects underwent a biopsy of the *vastus lateralis* and blood sampling.

## **Pulmonary function testing**

Standard pulmonary function tests including spirometry, lung volumes, and carbon monoxide diffusion capacity were obtained in all subjects during the initial evaluation according to described guidelines <sup>41</sup>. Results were related to previously published normal values <sup>42</sup>.

## **Muscle biopsy**

One needle biopsy of the *vastus lateralis*, performed as described by Bergström and routinely done in the laboratory <sup>43</sup> was obtained in each participant. Muscle specimens were frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C for future analysis.

## **Blood sampling**

The antecubital venous blood was centrifuged for 15 minutes, plasma was aliquoted, and stored at -80°C until further analysis. Commercial ELISA kits (Invitrogen, Ontario, Canada) were used to measure SAA1, IL-6, IL-8 and TNF plasma levels.

## **C2C12 culture**

Murine skeletal muscle cell, C2C12, were plated and grown in growth medium made of Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) with 4.5% glucose (HyClone, Logan, UT, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum, penicillin 50 U/ml, streptomycin 50 mg/ml (HyClone) and 5ng/ml bFGF (Promega, Madison, WI, USA) in a humidified 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator. The medium was changed every two days and the cultures examined by inverted-phase microscopy. When cultured cells reached a confluence of 70% they were dissociated enzymatically with trypsin (Gibco, Carlsbad, CA, USA) and seeded for immediate propagation, or stimulated for 4 or 24 hours with 2% plasma from patients with COPD (stable and exacerbated) or controls. To induce differentiation into myotubes, near to confluence myoblasts were

placed in differentiation medium made of DMEM with 1% glucose and supplemented with 2% horse serum (HS), penicillin 50 U/ml, and streptomycin 50 µg/ml (HyClone). Differentiation medium was replaced every day for 5 consecutive days. At the end of the differentiation process, recombinant SAA1 (Preprotech, Rocky Hill, NJ, USA) was added at the concentration of 0.5, 1.0 or 2.0 µg/ml for 24 hours.

## **Transfection**

C2C12 myoblasts at 50–60% confluence were transfected with 5mmol of siRNA p21 (CDK1a), siRNA SAA1, a positive control and a negative control (Ambion) using the Nucleofector transfection kit according to the manufacturer's instructions. Electroporation was carried out using the Lonza 4D-Nucleofector system (Lonza, Basel, Switzerland). Trypsinized cells were suspended in the growth medium. Then,  $5 \times 10^4$  cells were centrifuged (1,000 g×5 min) and the precipitated cells were suspended in 25 µl of nucleofactor S' solution and mixed gently with 1pmol of siRNA. The mixture was then electroporated (program B-032). Cells were collected and seeded in a plate for 2 hours and then stimulated for 24 hours in the presence of 10µg/ml of Lipopolysaccharide (LPS).

## **Real-Time PCR**

Total RNA extraction was performed from 15 mg of muscle or on C2C12 using a commercially available preparation (TRIzol<sup>®</sup> Reagent, Invitrogen, Burlington, Ontario, Canada). One µg of RNA was reverse transcribed to cDNA using Quantitect<sup>™</sup> Reverse Transcription Kit (Qiagen, Mississauga, Ontario, Canada). Real time PCR were performed in a Rotor-Gene<sup>™</sup> 6000 (Corbett Life Science, San Francisco, CA, USA) using Quantitect<sup>™</sup> SYBR<sup>®</sup> Green PCR Kit (Qiagen, Mississauga, Ontario, Canada). The comparative threshold cycles ( $\Delta$ CT) values for SAA1, p21, Atrogin, MuRF, Nedd4, Stat3, IL-1, IL-6 and TNF were normalized for RPLPO and 18s human reference genes and analyzed using the  $2^{-\Delta$ Ct method<sup>44</sup>.

## **Statistical analysis**

Results are expressed as mean ( $\pm$  SEM). Differences for all variables between groups were analyzed, using a one-way analysis of variance (ANOVA). Differences were considered to be significant for  $p < 0.05$ .

## 7.7 Results

### Subject's characteristics

Anthropometric characteristics and pulmonary function data are provided in Table 1. Patients and controls did not significantly differ regarding age, sex and body mass index. On average, patients had moderate-to-severe airflow obstruction: five patients had stage II, twelve patients had stage III, and the remaining patient had stage IV disease according to the GOLD classification<sup>45</sup>. As expected, lung function was preserved in controls. Mid-thigh muscle cross sectional area was significantly decreased by 24% in COPD compared to controls ( $p < 0.05$ ). Because of medical consideration, MTCSA and plethysmographic measurements were not obtained in exacerbated patients with COPD.

### SAA1 plasma levels is increased in patients with COPD

We first characterized the nature and the extent of the systemic inflammatory response in all three groups of subjects. No significant differences in SAA1 ( $p = 0.9$ ), IL-6 ( $p = 0.2$ ) and TNF ( $p = 0.7$ ) plasma levels were found between patients with stable COPD and controls (Figure 1A-1B-1D, respectively). IL-8 plasma levels showed a trend to be greater in patients with COPD ( $p = 0.05$ ) (Figure 1C). Although not statistically significant a 7.0-fold increase in SAA1 plasma level was reported in patients with acute exacerbation of their COPD (Figure 1A).

### Skeletal muscle SAA1 and p21 mRNAs are increased in patients with COPD

In a second step, we wanted to investigate if a local inflammatory response was present in muscle tissue. In patients with stable COPD, their mRNA expression of SAA1 was 19.3-fold greater compared to controls (Figure 2A). In patients with an acute exacerbation of their COPD, mRNA expression of SAA1 was 26217-fold greater compared to controls (Figure

2A). p21 mRNA levels were significantly elevated by 5.3-fold in patients with stable COPD and by 7.2-fold in patients with an acute exacerbation of their COPD compared to controls (Figure 2B). Furthermore, there was an increased mRNA expression of IL-6 and Stat3 in stable patients with COPD (1.8-fold and 15.7-fold respectively) (Figure 2C-2E). The non-muscle specific E3-ligase Nedd4 was significantly increased (4.2-fold) in stable patients with COPD.

Only when considering stable patients with COPD and controls, SAA1 mRNA positively correlate with IL-6 mRNA ( $R = 0.8197$ ), Stat3 mRNA ( $R = 0.7538$ ), p21 mRNA ( $R = 0.6414$ ) and Nedd4 mRNA ( $R = 0.6566$ ).

### **Recombinant SAA1 induces E3-ligases and p21.**

Because, the role of SAA1 is unknown in the development of the inflammatory response in muscle cells, C2C12 myotubes were treated with either recombinant SAA1 or LPS. Following a stimulation of 24 hours with recombinant SAA1 we observed an increase expression of Atrogin, MuRF, IL-6 and p21 mRNAs with the three doses used (Figure 3A-3B-3C-3D). The stimulation of 24 hours with LPS follows a similar pattern by increasing the expression of Atrogin, MuRF, IL-6 and p21 mRNA in a dose dependant fashion (Figure 3A-3B-3C-3D). Because of slightly higher cellular mortality with the dose of LPS 50 $\mu$ g/ml compared to others, furthers experiments will be conduct with the dose of LPS 10 $\mu$ g/ml.

### **Transfections of C2C12 myoblast with siRNA SAA1 or siRNA p21 accentuate the inflammatory response in the presence of LPS.**

To further investigate the role of SAA1 and p21 in muscle cells during an inflammatory response, transfection with siRNA were used to force the inhibition of the mRNA of SAA1 and the mRNA of p21. The efficiency of the transfection was calculated by real-time PCR by quantifying the amount of each mRNA of SAA1 and p21 while transfected compared to the control

condition. Following the transfection with the SAA1 siRNA, we observed a decreased accumulation of the SAA1 mRNA without or with the addition of LPS (100% and 60% respectively) (Figure 4A). Following the transfection with the p21 siRNA, we observed a decreased accumulation of the p21 mRNA without or with the addition of LPS (84% and 70% respectively) (Figure 4B).

The reaction of C2C12 during an inflammatory response without SAA1 and p21 was evaluated by quantifying the mRNA expression of Atrogin, MuRF, TNF, IL-1, IL-6, Nedd4, Stat3 and SOCS3. The simple addition of LPS increases the expression of Atrogin (1.4 fold), TNF (3.8 fold), IL-1 (4.2 fold) and IL-6 (22.5 fold) compare to the control value (Figure 5A, 5C, 5D and 5E). When C2C12 myoblasts are transfected with the siRNA of SAA1 in the presence of LPS, there is an increase expression of Atrogin (1.6 fold), TNF (5.5 fold), IL-1 (7.1 fold) and IL-6 (30.9 fold) compare to the control value (Figure 5A, 5C, 5D and 5E). Similarly, when C2C12 myoblasts are transfected with the siRNA of p21 in the presence of LPS, there is an increase expression of TNF (6.4 fold), IL-1 (6.9 fold), IL-6 (47.4 fold) and Nedd4 (2.7-fold) compare to the control value (Figure 5C, 5D, 5E and 5F).

### **Plasma from patients with COPD induces an inflammatory response in C2C12.**

The impact of plasma of patients with COPD on C2C12 myoblast were assess to determine the role of circulating factors in the blood on the mRNA expression of inflammatory cytokines, Jak/Stat signalling pathway and E3-ligases. The simple addition of 2% plasma from patients with COPD to the culture media of C2C12 increased the mRNA expression of TNF (3.7-fold) and decreased the mRNA expression of Nedd4 (0.6-fold) and SOCS3 (0.8-fold) after 24 hours of stimulation (Figure 6C, 6F and 6H). When patients with COPD are in an exacerbation of their disease, the addition of 2% plasma to the culture media of C2C12 increased the mRNA expression of Atrogin (1.7-fold), IL-6 (1.5-fold), Nedd4 (2.3-fold), Stat3 (1.7-fold) and decreased the mRNA expression of the inhibitor of Stat3, SOCS3 (0.6-fold) as early as 4



hours after the stimulation (Figure 6A, 6D, 6F, 6G and 6H). Plasma from exacerbated patients with COPD increased the mRNA expression of Atrogin (1.3-fold), MuRF (1.4-fold), TNF (14.3-fold) and p21 (1.4-fold) in C2C12 after 24 hours (Figure 6A, 6B, 6C and 6E).

## 7.8 Discussion

One of the most striking consequences of COPD is the reduction of muscle mass resulting in loss of endurance and strength <sup>46;47</sup>. Even if extensive works are being performed to understand the molecular basis behind this process no clear answer is yet available. SAA1 is often mentioned as potential contributor to the inflammatory response in COPD but is rarely measured in clinical settings or in skeletal muscle studies. Bozinovski et al. in 2008 eloquently demonstrated that SAA could in fact be a potential biomarker for acute exacerbations in COPD, but its presence in peripheral muscles had, to the best of our knowledge, never been investigated <sup>21</sup>. On the other hand, p21 has been shown to be upregulated in skeletal muscle of patients with COPD without any indication on its role except regulating the cell cycle. Therefore, further investigation into the mechanisms of SAA1 and p21 possible contribution to COPD related muscle dysfunction was needed. In accordance to previous findings <sup>22</sup>, results from this study confirm that SAA1 and p21 mRNA expression levels are both increased in the muscle tissue of patients with COPD. However, SAA1 protein levels in plasma were not significantly different between stable patients with COPD and controls while patients with acute exacerbation of their COPD had sustained elevation in SAA1 plasma levels. To further assess the role of SAA1 and p21 in the management of the inflammatory response and the contractile protein homeostasis in muscle cell, C2C12 myoblast were cultured with either recombinant SAA1 or siRNA against SAA1 and p21. It was found that recombinant SAA1 is able to induce E3-ligases, IL-6 and p21. Moreover, the forced inhibition of SAA1 and p21 by siRNA seemed to exacerbate the inflammatory response in C2C12 myoblast in the presence of LPS and therefore induced the expression of E3-ligases mRNA.

Despite all scientific data supporting a role for inflammation in skeletal muscle dysfunction observed in patients with COPD, there are still areas of uncertainties. A state of low-grade systemic inflammation is common but not universal in patients with COPD during stable phase <sup>48</sup>, a situation that may

be worsened during acute exacerbations of the disease <sup>49</sup>. For instance, in this study we only found elevated level of SAA1 in the group of exacerbated patients with COPD and IL-8 in both group of patients with COPD. Nonetheless, it is well known that pro-inflammatory molecules may induce muscle alterations at the cellular level <sup>48</sup> and the adverse effects of pro-inflammatory cytokines have been confirmed in experimental models of cachexia <sup>50</sup>. Inflammation can impair anabolism, influence muscle growth and contractility, induce apoptosis and enhance protein degradation through the ubiquitin-proteasome pathway <sup>51;52</sup>.

The SAA1 mRNA has been shown to be increased in several diseases including COPD and cancer <sup>21;53</sup>. The increase levels of SAA1 in the muscle of patients with COPD could be involved in the well described but not fully comprehended peripheral muscle wasting associated with COPD, especially during exacerbation where SAA1 levels are elevated. The subset of 7 exacerbated patients with COPD showed an average increase of  $\approx 26\ 000$  fold from controls. In the literature, SAA1 in combination with IL-6 has been associated with decreased IGF-1 signaling and increased protein degradation in L6 myotubes <sup>53</sup>. In this study we have shown that recombinant SAA1 can induce protein breakdown directly via the upregulation of Atrogin and MuRF mRNA in C2C12 myotubes.

There are emerging evidence supporting the notion that p21 could play a role in the regulation of the inflammatory response. Interestingly, we reported a 5.3 and 7.2 fold increase in the p21 mRNA expression level in skeletal muscle of stable and exacerbated patients with COPD compared to aged-matched controls when SAA1 mRNA is also upregulated and correlated. Overexpression of p21 in experimental arthritis joints has been demonstrated to inhibit pro-inflammatory molecule expression such as IL-1 $\beta$ , TNF, and IL-6 mRNA <sup>54</sup>. By a different approach, in the model of forced inhibition of SAA1 and p21 by siRNA we have shown an increase expression of those cytokines following the addition of LPS supporting a pivotal role for

p21 in the control of the inflammatory response. Since inflammation is known to alter muscle cell function and to promote the development of muscle atrophy<sup>50</sup>, the absence of p21 could trigger a strong inflammatory cascade and indirectly induce protein breakdown via the IL-6 signaling pathway. The mechanism behind the upregulation of SAA1 and p21 mRNA in the skeletal muscle of patients with COPD still need to be demonstrated but they could play a pivotal role at counteracting the deleterious effect of inflammation.

The relationship between SAA1 and p21 in the context of inflammation in skeletal muscle is still speculative but p21 can interact with Stat3 and inhibits its transcriptional activity<sup>55</sup> while Stat3 could regulate the transcription of SAA1. In the end, decrease activity of Stat3 by p21 could attenuate the SAA1 response during inflammation by a negative feedback control loop. Recombinant SAA1 is able to induce p21 mRNA in C2C12 myotubes and the positive correlations between SAA1, p21 and Stat3 mRNA in the skeletal muscle provide additional detail on the possible link between those factors. The upregulation of p21 by SAA1 could be a mechanism induced to protect cells from the inflammation and to stop the cell cycle if the inflammatory response is persistent. For example, in the mouse hippocampus, p21 is induced in response to acute systemic inflammation caused by LPS injection, restraining neuronal progenitor's proliferation and protecting them from inflammation induced-apoptosis<sup>56</sup>.

It is now well known that COPD is associated with significant systemic abnormalities. However, it is still unclear whether they represent consequences of the pulmonary disorder, or whether COPD should be considered as a systemic disease. These systemic abnormalities have been attributed to the increased level of systemic inflammation such as SAA1, at rest<sup>57;58</sup>, after exercise<sup>59;60</sup> and during acute exacerbation<sup>61;62</sup>. However, the link between the inflammatory responses that take place in the lung and the muscle abnormalities observed in patients with COPD is still unknown. In this study, we demonstrate for the first time the existence of molecule in the

plasma of patients with COPD, specifically during exacerbation, that triggers an inflammatory response in C2C12 myoblast via TNF, IL-6, and Stat3 and induce protein degradation via Atrogin, MuRF and Nedd4. Clearly, the inflammatory response that takes place in the lung of patients with COPD release factors in the blood, including SAA1, able to alter protein homeostasis in muscles cells.

### **Summary and Conclusion**

Without a doubt, the link between SAA1 and p21 as a possible mediator of the inflammatory response and muscle dysfunction in patients with COPD merits further investigations. SAA1 and p21 are both upregulated in skeletal muscle of patients with COPD. SAA1 can induce p21 probably in a negative feedback control loop through the IL-6/Jak2/Stat3 signalling pathway, who controls SAA1 transcription. The force inhibition by siRNA of SAA1 and p21 seems to exacerbate muscle cells, demonstrating a key role for SAA1 and p21 in the control of the inflammatory response. Further studies are needed to better characterise the relationship between SAA1 and p21 and their upregulation in skeletal muscle of patients with COPD but we provide strong basis behind this process.

## **7.9 Acknowledgements**

The authors acknowledge the contribution of Marthe Bélanger, Marie-Josée Breton, Brigitte Jean, Josée Picard for their help in accomplishing this study.

## 7.10 References

1. Llovera, M., C. Garcia-Martinez, N. Agell, F. J. Lopez-Soriano, F. J. Authier, R. K. Gherardi, and J. M. Argiles. 1998. Ubiquitin and proteasome gene expression is increased in skeletal muscle of slim AIDS patients. *Int.J Mol.Med.* 2:69-73.
2. Tisdale, M. J. 2002. Cachexia in cancer patients. *Nat Rev.Cancer* 2:862-871.
3. Price, S. R., J. L. Bailey, X. Wang, C. Jurkovitz, B. K. England, X. Ding, L. S. Phillips, and W. E. Mitch. 1996. Muscle wasting in insulinopenic rats results from activation of the ATP-dependent, ubiquitin-proteasome proteolytic pathway by a mechanism including gene transcription. *J.Clin.Invest* 98:1703-1708.
4. Brooks, S. V. and J. A. Faulkner. 1994. Skeletal muscle weakness in old age: underlying mechanisms. *Med.Sci.Sports Exerc.* 26:432-439.
5. Tiao, G., J. M. Fagan, N. Samuels, J. H. James, K. Hudson, M. Lieberman, J. E. Fischer, and P. O. Hasselgren. 1994. Sepsis stimulates nonlysosomal, energy-dependent proteolysis and increases ubiquitin mRNA levels in rat skeletal muscle. *J Clin.Invest* 94:2255-2264.
6. Debigare, R., K. Marquis, C. H. Cote, R. R. Tremblay, A. Michaud, P. Leblanc, and F. Maltais. 2003. Catabolic/anabolic balance and muscle wasting in patients with COPD. *Chest* 124:83-89.
7. Gosselink, R., T. Troosters, and M. Decramer. 1996. Peripheral muscle weakness contributes to exercise limitation in COPD. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 153:976-980.

8. Marquis, K., R. Debigare, Y. Lacasse, P. LeBlanc, J. Jobin, G. Carrier, and F. Maltais. 2002. Midthigh muscle cross-sectional area is a better predictor of mortality than body mass index in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 166:809-813.
9. Wust, R. C. and H. Degens. 2007. Factors contributing to muscle wasting and dysfunction in COPD patients. *Int.J.Chron.Obstruct.Pulmon.Dis.* 2:289-300.
10. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD). Global Strategy for the Diagnosis, Management and Prevention of COPD. 2008. 6-11-0090.
11. Agusti, A. and J. B. Soriano. 2008. COPD as a systemic disease. *COPD.* 5:133-138.
12. Wouters, E. F. 2005. Local and systemic inflammation in chronic obstructive pulmonary disease. *Proc.Am.Thorac.Soc.* 2:26-33.
13. Barnes, P. J. and B. R. Celli. 2009. Systemic manifestations and comorbidities of COPD. *Eur.Respir.J.* 33:1165-1185.
14. Barreiro, E., A. M. Schols, M. I. Polkey, J. B. Galdiz, H. R. Gosker, E. B. Swallow, C. Coronell, and J. Gea. 2008. Cytokine profile in quadriceps muscles of patients with severe COPD. *Thorax* 63:100-107.
15. Crul, T., M. A. Spruit, G. Gayan-Ramirez, R. Quarck, R. Gosselink, T. Troosters, F. Pitta, and M. Decramer. 2007. Markers of inflammation and disuse in *vastus lateralis* of chronic obstructive pulmonary disease patients. *Eur.J.Clin.Invest* 37:897-904.
16. Sin, D. D. and W. D. Reid. 2008. Is inflammation good, bad or irrelevant for skeletal muscles in COPD? *Thorax* 63:95-96.



17. Urieli-Shoval, S., R. P. Linke, and Y. Matzner. 2000. Expression and function of serum amyloid A, a major acute-phase protein, in normal and disease states. *Curr.Opin.Hematol.* 7:64-69.
18. Urieli-Shoval, S., R. P. Linke, and Y. Matzner. 2000. Expression and function of serum amyloid A, a major acute-phase protein, in normal and disease states. *Curr.Opin.Hematol.* 7:64-69.
19. Benigni, F., G. Fantuzzi, S. Sacco, M. Sironi, P. Pozzi, C. A. Dinarello, J. D. Sipe, V. Poli, M. Cappelletti, G. Paonessa, D. Pennica, N. Panayotatos, and P. Ghezzi. 1996. Six different cytokines that share GP130 as a receptor subunit, induce serum amyloid A and potentiate the induction of interleukin-6 and the activation of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis by interleukin-1. *Blood* 87:1851-1854.
20. Urieli-Shoval, S., R. P. Linke, and Y. Matzner. 2000. Expression and function of serum amyloid A, a major acute-phase protein, in normal and disease states. *Curr.Opin.Hematol.* 7:64-69.
21. Bozinovski, S., A. Hutchinson, M. Thompson, L. Macgregor, J. Black, E. Giannakis, A. S. Karlsson, R. Silvestrini, D. Smallwood, R. Vlahos, L. B. Irving, and G. P. Anderson. 2008. Serum amyloid a is a biomarker of acute exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 177:269-278.
22. Debigare, R., F. Maltais, C. H. Cote, A. Michaud, M. A. Caron, M. Mofarrahi, P. LeBlanc, and S. N. Hussain. 2008. Profiling of mRNA expression in quadriceps of patients with COPD and muscle wasting. *COPD.* 5:75-84.
23. Urieli-Shoval, S., R. P. Linke, and Y. Matzner. 2000. Expression and function of serum amyloid A, a major acute-phase protein, in normal and disease states. *Curr.Opin.Hematol.* 7:64-69.

24. Benigni, F., G. Fantuzzi, S. Sacco, M. Sironi, P. Pozzi, C. A. Dinarello, J. D. Sipe, V. Poli, M. Cappelletti, G. Paonessa, D. Pennica, N. Panayotatos, and P. Ghezzi. 1996. Six different cytokines that share GP130 as a receptor subunit, induce serum amyloid A and potentiate the induction of interleukin-6 and the activation of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis by interleukin-1. *Blood* 87:1851-1854.
25. Heinrich, P. C., I. Behrmann, S. Haan, H. M. Hermanns, G. Muller-Newen, and F. Schaper. 2003. Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem.J* 374:1-20.
26. Heinrich, P. C., I. Behrmann, S. Haan, H. M. Hermanns, G. Muller-Newen, and F. Schaper. 2003. Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem.J* 374:1-20.
27. Heinrich, P. C., I. Behrmann, S. Haan, H. M. Hermanns, G. Muller-Newen, and F. Schaper. 2003. Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem.J* 374:1-20.
28. Nishikawa, T., K. Hagihara, S. Serada, T. Isobe, A. Matsumura, J. Song, T. Tanaka, I. Kawase, T. Naka, and K. Yoshizaki. 2008. Transcriptional complex formation of c-Fos, Stat3, and hepatocyte NF-1 alpha is essential for cytokine-driven C-reactive protein gene expression. *J Immunol.* 180:3492-3501.
29. Song, C., K. Hsu, E. Yamen, W. Yan, J. Fock, P. K. Witting, C. L. Geczy, and S. B. Freedman. 2009. Serum amyloid A induction of cytokines in monocytes/macrophages and lymphocytes. *Atherosclerosis* 207:374-383.
30. Tiwari, P., L. P. Tripathi, T. Nishikawa-Matsumura, S. Ahmad, S. N. Song, T. Isobe, K. Mizuguchi, and K. Yoshizaki. 2013. Prediction and experimental validation of a putative non-consensus binding site for transcription factor Stat3 in serum amyloid A gene promoter. *Biochim.Biophys.Acta* 1830:3650-3655.

31. Hagihara, K., T. Nishikawa, Y. Sugamata, J. Song, T. Isobe, T. Taga, and K. Yoshizaki. 2005. Essential role of Stat3 in cytokine-driven NF-kappaB-mediated serum amyloid A gene expression. *Genes Cells* 10:1051-1063.
32. Coqueret, O. and H. Gascan. 2000. Functional interaction of Stat3 transcription factor with the cell cycle inhibitor p21WAF1/CIP1/SDI1. *J Biol Chem.* 275:18794-18800.
33. Coqueret, O. and H. Gascan. 2000. Functional interaction of Stat3 transcription factor with the cell cycle inhibitor p21WAF1/CIP1/SDI1. *J Biol Chem.* 275:18794-18800.
34. Lecker, S. H., A. L. Goldberg, and W. E. Mitch. 2006. Protein degradation by the ubiquitin-proteasome pathway in normal and disease states. *J.Am.Soc.Nephrol.* 17:1807-1819.
35. Glickman, M. H. and A. Ciechanover. 2002. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol Rev.* 82:373-428.
36. Batt, J., J. Bain, J. Goncalves, B. Michalski, P. Plant, M. Fahnstock, and J. Woodgett. 2006. Differential gene expression profiling of short and long term denervated muscle. *FASEB J.* 20:115-117.
37. Sandri, M., C. Sandri, A. Gilbert, C. Skurk, E. Calabria, A. Picard, K. Walsh, S. Schiaffino, S. H. Lecker, and A. L. Goldberg. 2004. Foxo transcription factors induce the atrophy-related ubiquitin ligase atrogin-1 and cause skeletal muscle atrophy. *Cell* 117:399-412.
38. Koncarevic, A., R. W. Jackman, and S. C. Kandarian. 2007. The ubiquitin-protein ligase Nedd4 targets Notch1 in skeletal muscle and distinguishes the subset of atrophies caused by reduced muscle tension. *FASEB J.* 21:427-437.

39. Plant, P. J., D. Brooks, M. Faughnan, T. Bayley, J. Bain, L. Singer, J. Correa, D. Pearce, M. Binnie, and J. Batt. 2010. Cellular markers of muscle atrophy in chronic obstructive pulmonary disease. *Am.J Respir.Cell Mol.Biol* 42:461-471.
40. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD). Global Strategy for the Diagnosis, Management and Prevention of COPD. 2010.
41. American Thoracic Society and European Respiratory Society. Standards for the diagnosis and treatment of patients with chronic obstructive pulmonary disease. 2004. 6-11-0090.
42. Quanjer, P. H., G. J. Tammeling, J. E. Cotes, O. F. Pedersen, R. Peslin, and J. C. Yernault. 1993. Lung volumes and forced ventilatory flows. Report Working Party Standardization of Lung Function Tests, European Community for Steel and Coal. Official Statement of the European Respiratory Society. *Eur.Respir.J Suppl* 16:5-40.
43. Doucet, M., A. P. Russell, B. Leger, R. Debigare, D. R. Joannisse, M. A. Caron, P. LeBlanc, and F. Maltais. 2007. Muscle atrophy and hypertrophy signaling in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 176:261-269.
44. Livak, K. J. and T. D. Schmittgen. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25:402-408.
45. Fabbri, L. M. and S. S. Hurd. 2003. Global Strategy for the Diagnosis, Management and Prevention of COPD: 2003 update. *Eur.Respir.J.* 22:1-2.

46. Debigare, R. and F. Maltais. 2008. The major limitation to exercise performance in COPD is lower limb muscle dysfunction. *J.Appl.Physiol* 105:751-753.
47. Bernard, S., P. LeBlanc, F. Whittom, G. Carrier, J. Jobin, R. Belleau, and F. Maltais. 1998. Peripheral muscle weakness in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 158:629-634.
48. Gan, W. Q., S. F. Man, A. Senthilselvan, and D. D. Sin. 2004. Association between chronic obstructive pulmonary disease and systemic inflammation: a systematic review and a meta-analysis. *Thorax* 59:574-580.
49. Spruit, M. A., R. Gosselink, T. Troosters, A. Kasran, G. Gayan-Ramirez, P. Bogaerts, R. Bouillon, and M. Decramer. 2003. Muscle force during an acute exacerbation in hospitalised patients with COPD and its relationship with CXCL8 and IGF-I. *Thorax* 58:752-756.
50. Langen, R. C., A. M. Schols, M. C. Kelders, d. van, V, E. F. Wouters, and Y. M. Janssen-Heininger. 2006. Muscle wasting and impaired muscle regeneration in a murine model of chronic pulmonary inflammation. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol* 35:689-696.
51. Broekhuizen, R., E. F. Wouters, E. C. Creutzberg, and A. M. Schols. 2006. Raised CRP levels mark metabolic and functional impairment in advanced COPD. *Thorax* 61:17-22.
52. Pinto-Plata, V. M., H. Mullerova, J. F. Toso, M. Feudjo-Tepie, J. B. Soriano, R. S. Vessey, and B. R. Celli. 2006. C-reactive protein in patients with COPD, control smokers and non-smokers. *Thorax* 61:23-28.
53. Bonetto, A., T. Aydogdu, N. Kunzevitzky, D. C. Guttridge, S. Khuri, L. G. Koniaris, and T. A. Zimmers. 2011. Stat3 activation in skeletal

muscle links muscle wasting and the acute phase response in cancer cachexia. PLoS.ONE. 6:e22538.

54. Coqueret, O. and H. Gascan. 2000. Functional interaction of Stat3 transcription factor with the cell cycle inhibitor p21WAF1/CIP1/SDI1. J Biol Chem. 275:18794-18800.

55. Coqueret, O. and H. Gascan. 2000. Functional interaction of Stat3 transcription factor with the cell cycle inhibitor p21WAF1/CIP1/SDI1. J Biol Chem. 275:18794-18800.

56. Zonis, S., V. A. Ljubimov, M. Mahgerefteh, R. N. Pechnick, K. Wawrowsky, and V. Chesnokova. 2013. p21 restrains hippocampal neurogenesis and protects neuronal progenitors from apoptosis during acute systemic inflammation. Hippocampus.

57. Vernooij, J. H., M. Kucukaycan, J. A. Jacobs, N. H. Chavannes, W. A. Buurman, M. A. Dentener, and E. F. Wouters. 2002. Local and systemic inflammation in patients with chronic obstructive pulmonary disease: soluble tumor necrosis factor receptors are increased in sputum. Am.J.Respir.Crit Care Med. 166:1218-1224.

58. Schols, A. M., W. A. Buurman, Staal van den Brekel AJ, M. A. Dentener, and E. F. Wouters. 1996. Evidence for a relation between metabolic derangements and increased levels of inflammatory mediators in a subgroup of patients with chronic obstructive pulmonary disease. Thorax 51:819-824.

59. van Helvoort, H. A., Y. F. Heijdra, H. M. Thijs, J. Vina, G. J. Wanten, and P. N. Dekhuijzen. 2006. Exercise-induced systemic effects in muscle-wasted patients with COPD. Med.Sci.Sports Exerc. 38:1543-1552.

60. Rabinovich, R. A., M. Figueras, E. Ardite, N. Carbo, T. Troosters, X. Filella, J. A. Barbera, J. C. Fernandez-Checa, J. M. Argiles, and

J. Roca. 2003. Increased tumour necrosis factor-alpha plasma levels during moderate-intensity exercise in COPD patients. *Eur.Respir.J.* 21:789-794.

61. Seemungal, T., R. Harper-Owen, A. Bhowmik, I. Moric, G. Sanderson, S. Message, P. Maccallum, T. W. Meade, D. J. Jeffries, S. L. Johnston, and J. A. Wedzicha. 2001. Respiratory viruses, symptoms, and inflammatory markers in acute exacerbations and stable chronic obstructive pulmonary disease. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 164:1618-1623.

62. Wedzicha, J. A., T. A. Seemungal, P. K. Maccallum, E. A. Paul, G. C. Donaldson, A. Bhowmik, D. J. Jeffries, and T. W. Meade. 2000. Acute exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease are accompanied by elevations of plasma fibrinogen and serum IL-6 levels. *Thromb.Haemost.* 84:210-215.

## 7.11 Tables

**Table 1: Subjects characteristics**

	<b>Controls</b> (n= 10)	<b>COPD</b> (n=11)	<b>Exacerbated</b> (n=7)
<b>Age (years)</b>	65 ± 2	67 ± 1	66 ± 2
<b>BMI (kg/m<sup>2</sup>)</b>	28 ± 1	27 ± 1	26 ± 3
<b>FEV<sub>1</sub>, L</b>	3.4 ± 0.1	1.3 ± 0.1 <sup>a</sup>	1.4 ± 0.2 <sup>a</sup>
<b>FEV<sub>1</sub>, % predicted</b>	118 ± 3	45 ± 2 <sup>a</sup>	44 ± 8 <sup>a</sup>
<b>FEV<sub>1</sub> / FVC, %</b>	79 ± 1	38 ± 1 <sup>a</sup>	54 ± 3 <sup>a</sup>
<b>TLC, % predicted</b>	106 ± 3	122 ± 2 <sup>a</sup>	N/A
<b>RV, % predicted</b>	97 ± 5	167 ± 7 <sup>a</sup>	N/A
<b>DL<sub>CO</sub>, % predicted</b>	103 ± 2	60 ± 3 <sup>a</sup>	47 ± 4
<b>MTCSA (cm<sup>2</sup>)</b>	112.8 ± 5.8	83.3 ± 4.8 <sup>a</sup>	N/A

**Definition of abbreviations: BMI = Body mass index; FEV<sub>1</sub> = Forced expiratory volume in 1 second; TLC = total lung capacity; RV = Residual volume; DLCO = Diffusing capacity of carbon monoxide; MTCSA = Mid-thigh cross-sectional area.**



## 7.12 Figure legends

**Figure 1:** Plasma levels of A) SAA1, B) IL-6, C) IL-8 AND D) TNF in controls (CTRL), stable patients with COPD (COPD) and exacerbated patients with COPD (COPD EXA). Solid bar represents the mean of the group.

\* represents a statistically significant difference ( $p < 0.05$ ).

**Figure 2:** Quadriceps mRNA expression of A) SAA1, B) p21, C) IL-6 D) Stat3 E) Jak2 and F) Nedd4 in controls (CTRL), stable patients with COPD (COPD) and exacerbated patients with COPD (COPD EXA). A distinct letter between above graph bars represents a statistically significant difference ( $p < 0.05$ ).

**Figure 3:** C2C12 mRNA expression of A) Atrogin, B) MuRF, C) IL-6 and D) p21 in response of recombinant SAA1 (0 $\mu$ g, 0.5 $\mu$ g, 1 $\mu$ g and 2 $\mu$ g) and lipopolysaccharide (0 $\mu$ g, 1 $\mu$ g, 10 $\mu$ g and 50 $\mu$ g) after a stimulation of 24 hours on C2C12 myotubes.

\* represents a statistically significant difference compared to control value ( $p < 0.05$ ).

**Figure 4:** C2C12 myoblasts were transfected with a siRNA against SAA1 and a siRNA against p21 with or without the addition of LPS (10 $\mu$ g/ml) 2 hours after the transfection and for a period of 24 hours. The mRNA expression of A) SAA1 and B) p21 were quantified to determine the efficiency of the transfection.

\* represents a statistically significant difference compared to control value ( $p < 0.05$ ).

† represents a statistically significant difference compared to control value ( $p < 0.1$ ).

**Figure 5:** C2C12 myoblasts were transfected with a siRNA against SAA1 and a siRNA against p21 with or without the addition of LPS (10 $\mu$ g/ml) 2 hours after the transfection and for a period of 24 hours. The mRNA expression E3

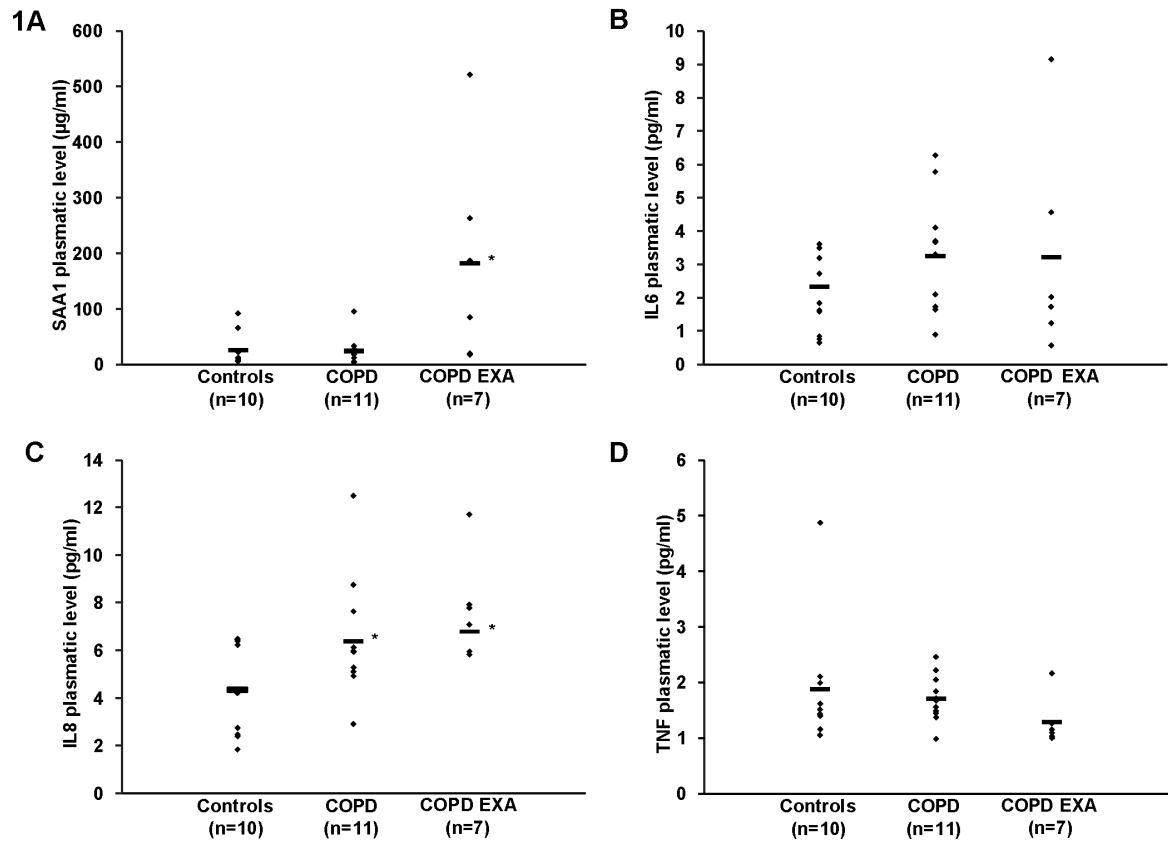
ligases A) Atrogin, B) MuRF C) IL-1 D) TNF E) IL-6, F) Nedd4 G) Stat3 and H) SOCS3 were quantified.

\* represents a statistically significant difference compared to control value (p<0.05).

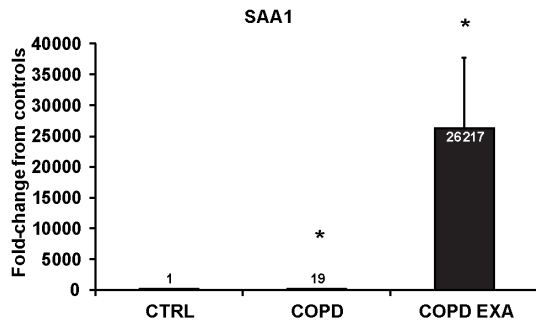
† represents a statistically significant difference compared to control value (p<0.1).

**Figure 6:** C2C12 myoblasts were exposed to 2% plasma of control (CTRL), stable patients with COPD (COPD) and exacerbated patients with COPD (COPD EXA) for a period of 4 and 24 hours. mRNA expression of A) Atrogin, B) MuRF C) TNF D) IL-6 E) p21 F) Nedd4 G) Stat3 and H) SOCS3 were quantified.

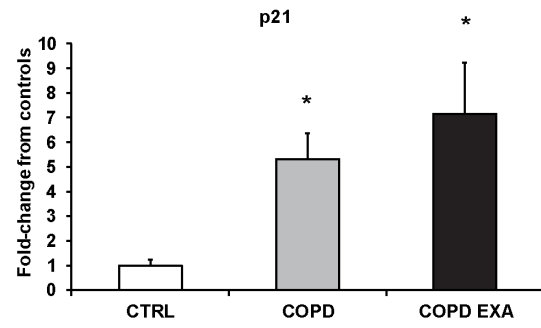
### 7.13 Figures



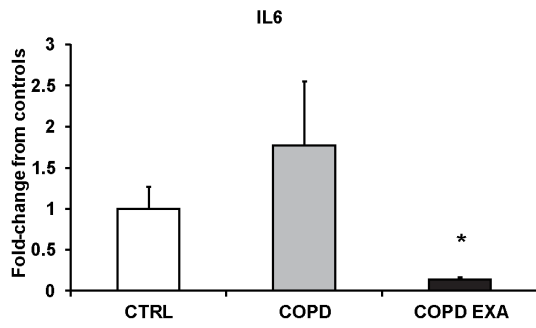
2A



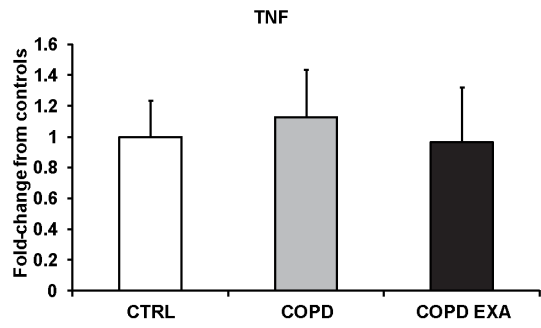
B



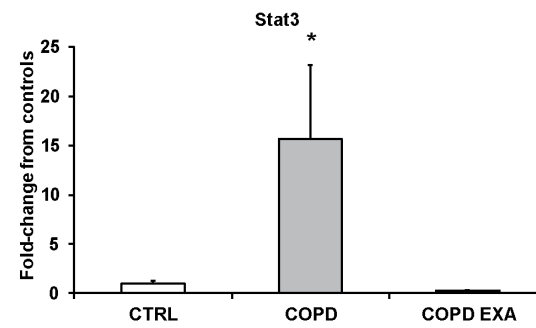
C



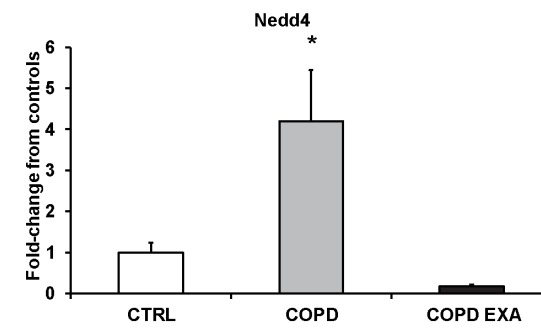
D

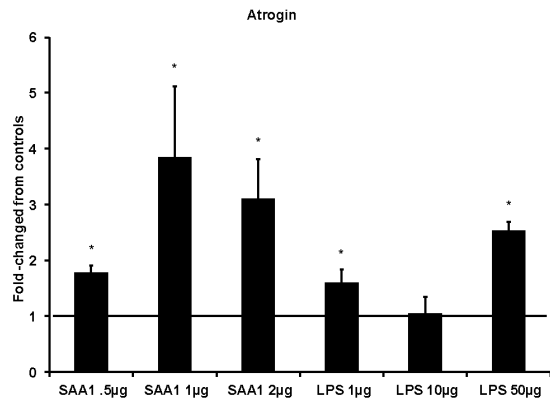
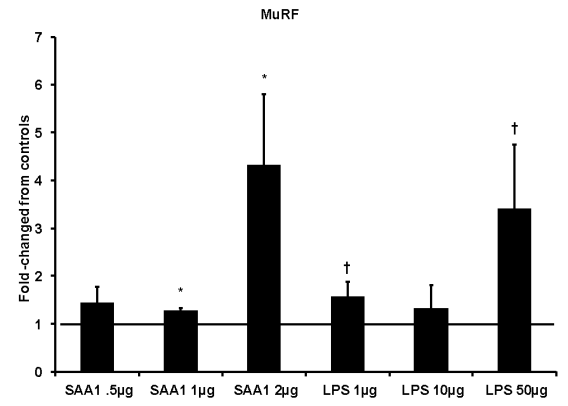
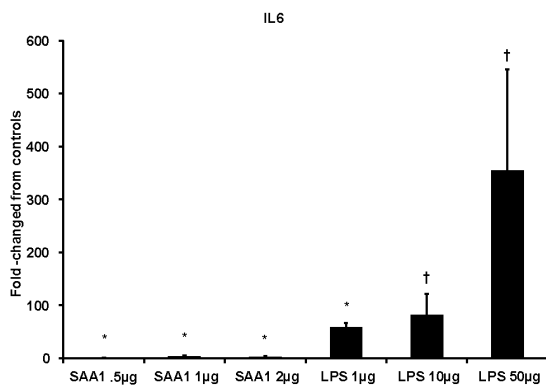
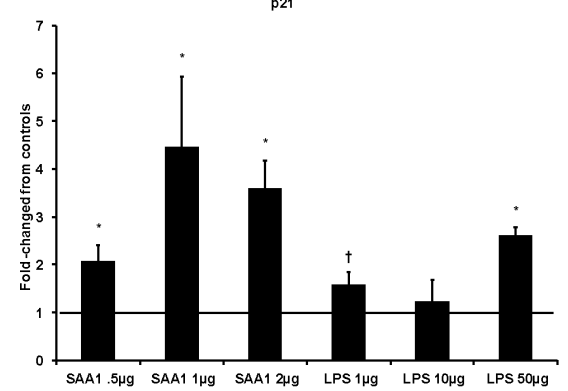


E

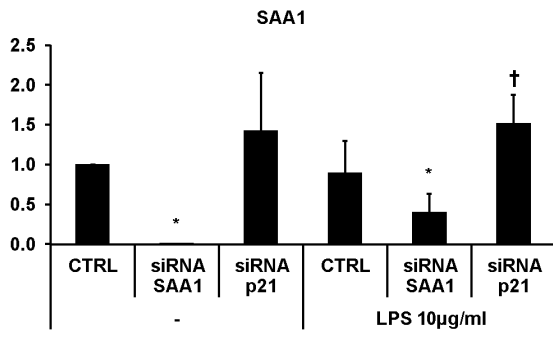


F

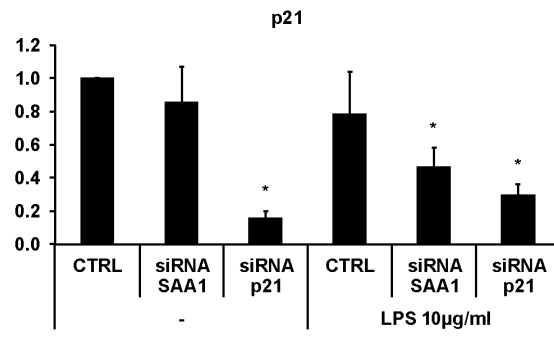


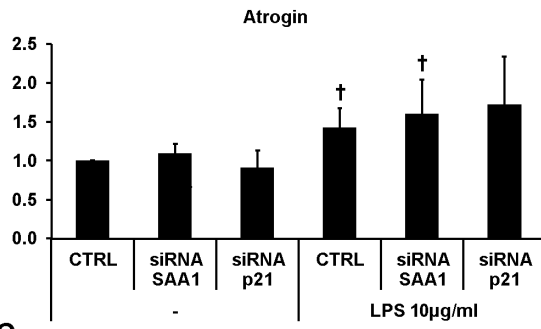
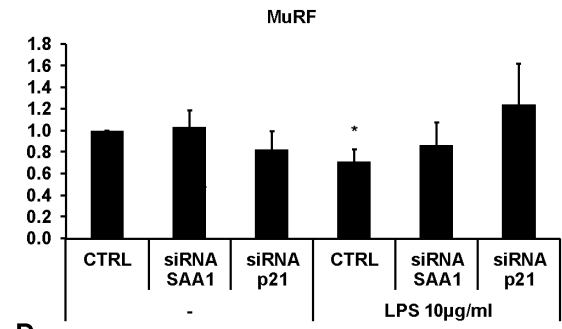
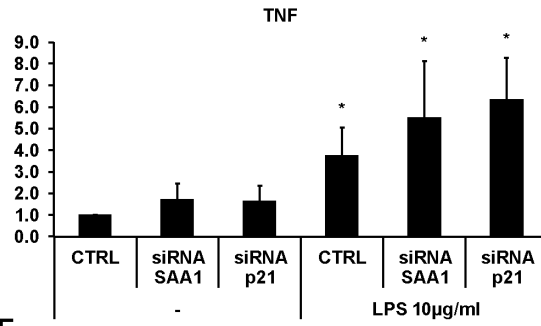
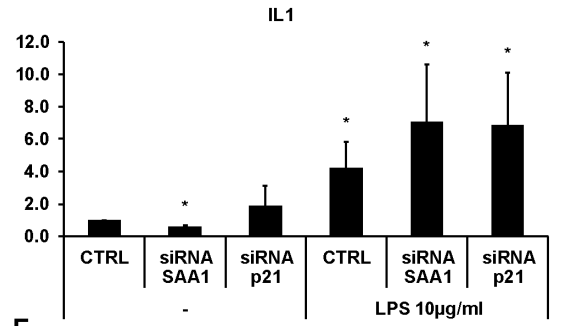
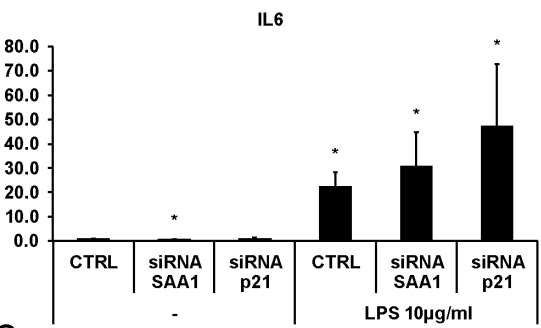
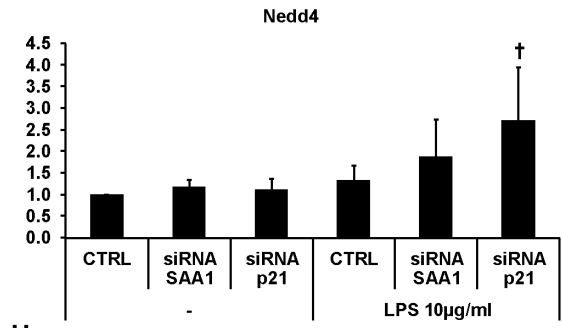
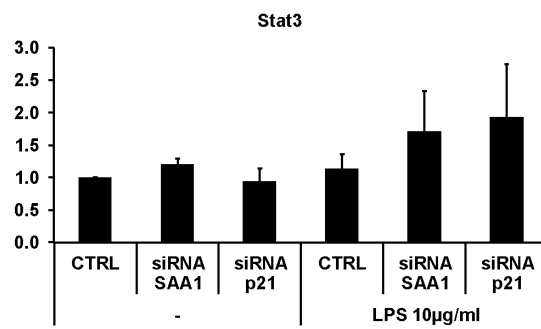
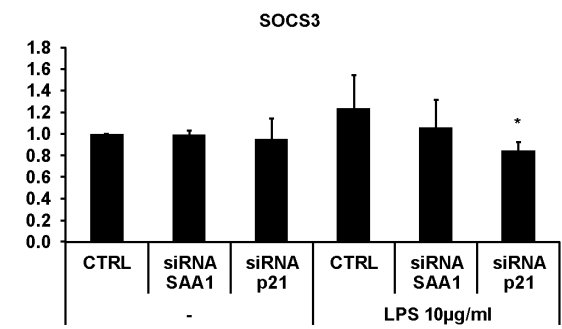
**3A****B****C****D**

4A

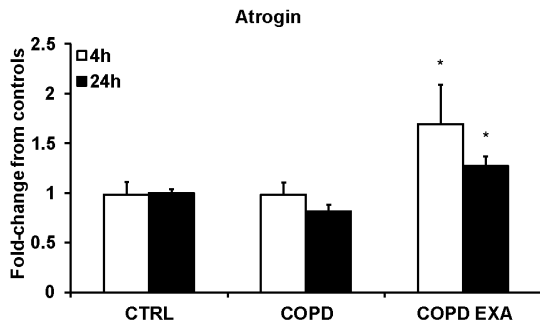


B

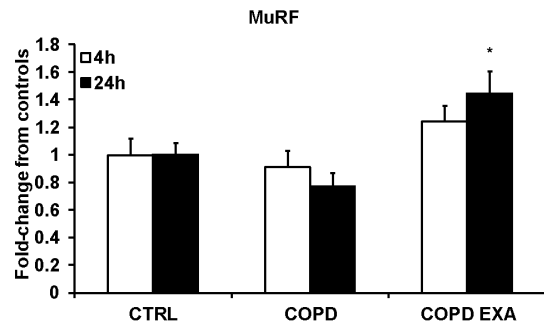


**5A****B****C****D****E****F****G****H**

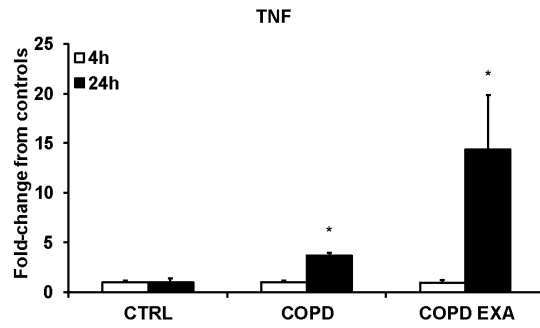
6A



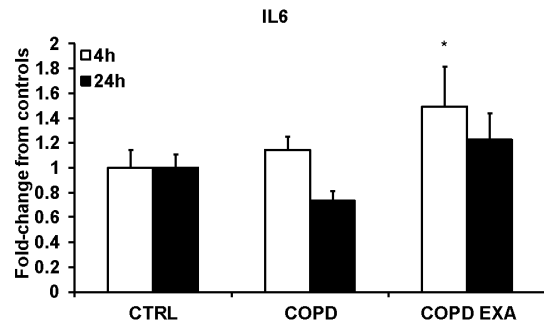
B



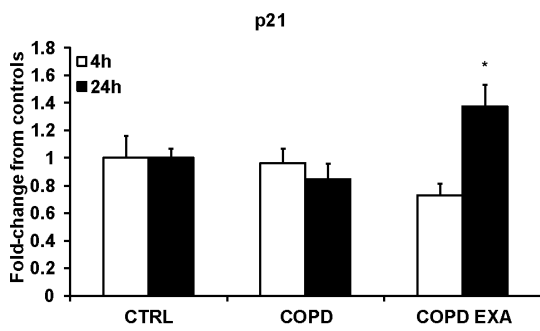
C



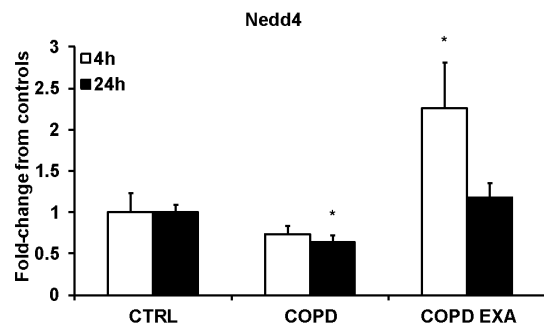
D



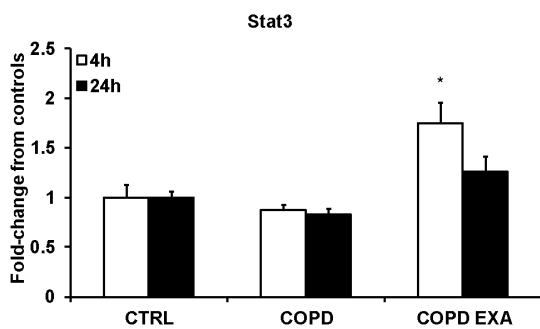
E



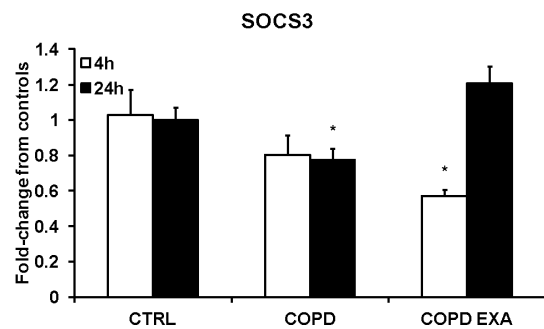
F



G



H





## **CHAPITRE VIII**

### **DISCUSSION GÉNÉRALE**

## Chapitre 8: Discussion générale

Cette thèse avait comme objectif principal de démontrer si une altération de la régénération musculaire contribuait à la dysfonction musculaire observée chez les patients ayant une MPOC. Dans un premier temps, nous avons évalué si le muscle squelettique des sujets ayant une MPOC subissait un vieillissement prématuré tel que démontré par un raccourcissement des télomères des cellules musculaires et des cellules satellites (Chapitre 3). Ensuite, nous nous sommes attardé à vérifier si les cellules satellites conservaient leurs capacités à proliférer et à se différencier normalement (Chapitre 4) et si, en réponse à un stimulus, elles étaient aptes à réparer le tissu musculaire (Chapitre 5). Puisque la MPOC affecte différemment les muscles périphériques des muscles respiratoires, nous avons évalué comment la maladie pulmonaire affectait les cellules satellites dans deux groupes musculaires distincts (quadriceps et diaphragme) (Chapitre 6). La MPOC est une maladie pulmonaire qui, en plus d'occasionner des problèmes aux poumons, affecte également des organes distants. Les liens de causalité entre l'affection primaire et les différentes comorbidités sont toujours nébuleux. Dans la dernière étude de cette thèse (Chapitre 7), nous avons voulu évaluer l'impact de l'environnement systémique, et plus particulièrement SAA1 et p21, dans leurs capacités à induire la dégradation protéique dans les cellules musculaires.

Une discussion exhaustive est comprise dans chacun des manuscrits de cette thèse. Le présent chapitre ne se veut pas être une répétition de celles-ci, mais bien une discussion générale des résultats obtenus. De plus, ces résultats seront mis en contexte avec la littérature actuelle traitant des différents sujets abordés contribuant à la dysfonction musculaire associée à la MPOC.

### Étude 1 (chapitre 3)

Dans l'étude présentée au chapitre 3, nous avons posé l'hypothèse que les changements morphologiques ayant cours dans le muscle lors du développement et de la progression de la maladie le rendaient plus susceptible aux dommages et par le fait même subissait un vieillissement prématuré. Ce vieillissement prématuré se traduisait par un raccourcissement des télomères qui détermine la durée de vie de toutes cellules somatiques.

406

#### Est-ce que les cellules satellites subissent un vieillissement prématuré?

Les principales conclusions de cette étude abondent en ce sens. Les résultats montrent une augmentation des noyaux centraux chez les patients ayant une MPOC et une MTCSA  $> 70 \text{ cm}^2$ , suggérant une augmentation des dommages musculaires. Chez ces mêmes patients, une diminution de la longueur maximale des télomères a été observée témoignant d'une surutilisation de l'activité des cellules satellites. Chez les sujets ayant une MPOC et une MTCSA  $< 70 \text{ cm}^2$ , la proportion des noyaux centraux était de retour aux valeurs des sujets ayant des fonctions respiratoires normales, mais présentait, un raccourcissement de la longueur minimale de leurs télomères soit les télomères des cellules satellites. Ces résultats suggèrent que le tissu musculaire au cours du développement de la maladie est capable de maintenir la masse musculaire via l'activation des cellules satellites, et ce, jusqu'à l'épuisement de leur potentiel de régénération. C'est alors que s'en suit un déclin graduel de la masse musculaire, observation appuyée par les corrélations positives entre la longueur des télomères et la surface musculaire à la mi-cuisse. En résumé, au fur et à mesure que la maladie pulmonaire progresse, la diminution des fonctions respiratoires coïncide avec une diminution de la masse musculaire. Les changements physiopathologiques systémiques engendrés par la maladie induiront une fragilisation locale du muscle et l'augmentation des dommages musculaires.

<sup>406</sup> Ainsi, il y aura une augmentation de l'activité des cellules satellites jusqu'à

l'épuisement de leurs potentiels contribuant au développement de l'atrophie musculaire chez les patients ayant une MPOC. On retrouve une certaine littérature sur la sénescence répllicative et le vieillissement prématuré dans une autre pathologie causant une atrophie musculaire, soit la Dystrophie Musculaire de Duchenne (DMD). Il est intéressant de noter que ce phénomène se produit de manière accélérée chez les patients ayant une DMD causé par l'absence de la protéine structurale la dystrophine.<sup>406</sup> L'absence de la dystrophine déstabilise les fibres musculaires en plus d'augmenter leur fragilité ce qui a pour effet d'accentuer la demande envers les cellules satellites jusqu'à leurs sénescences.<sup>406</sup>

Chaque organe en différenciation terminale a une longévité déterminée par la longueur de ses télomères. Par contre, il existe des mécanismes dans certains types cellulaires responsables de la préservation des télomères.<sup>407</sup> Dans les cellules souches embryonnaires, les télomères sont maintenus par des enzymes nommées télomérases<sup>408</sup> qui ajoutent des séquences télomériques TTAGGG à l'extrémité des chromosomes. Puisque le muscle squelettique est composé de cellules en différenciation terminale, la présence de ce type d'enzyme n'était pas suspectée. Par contre, une étude récemment publiée a démontré que les cellules mésenchymateuses musculaires, telles que les cellules satellites, possèdent une certaine activité télomérase contrairement aux cellules musculaires, comme les myoblastes.<sup>409</sup> Il faut alors se demander si la longueur des télomères reflète vraiment l'historique de réplication puisque les cellules satellites bénéficient d'une certaine activité de la télomérase. Une partie de la réponse provient d'un article étudiant les muscles de sujets haltérophiles publiés en 2008. Les télomères dans leurs muscles squelettiques ne subissent pas de raccourcissement anormal, et ce, même avec une forte demande envers les cellules satellites.<sup>407</sup> Plus encore, les télomères de ces sujets avaient tendance à être plus longs comparativement à deux sujets actifs sans histoire d'entraînement en résistance.<sup>407</sup> Le mécanisme derrière ce phénomène n'a pas été démontré malgré la probabilité d'un certain niveau d'activité de la télomérase. Chez des

athlètes d'endurance ayant une myopathie nommée: « Fatigue Athlete Myopathic Syndrome (FAMS) » une sévère réduction de la longueur des télomères explique la fatigue inhérente à l'exercice chez ces patients.<sup>374</sup> L'ensemble de ces résultats suggère que bien qu'il y ait des mécanismes pour maintenir la longueur des télomères, si les perturbations environnementales sont excessives, l'équilibre se déplace vers un raccourcissement des télomères. Donc, les muscles squelettiques peuvent compenser un certain niveau de perturbations de l'environnement jusqu'à ce qu'elles excèdent les capacités de régulation des télomères. Chez les patients ayant une MPOC, il semblerait que l'activité des télomérases ne soit pas suffisante pour maintenir la longueur des télomères et empêcher la sénescence répllicative.

Il est important de noter qu'en plus d'une augmentation des cycles de régénérations, d'autres facteurs peuvent venir compromettre l'intégrité des télomères, telle l'augmentation du stress oxydant. De par leur contenu riche en guanine et cytosine, les télomères sont des cibles de choix pour les dérivés réactifs de l'oxygène qui accentuent la dégradation des télomères.<sup>410</sup> La contribution de ce phénomène sur le raccourcissement des télomères n'est pas connue dans les muscles des sujets ayant une MPOC. Par contre, on sait que les sujets atteints d'une MPOC ont des niveaux plus élevés de stress oxydants et que suite à un exercice, les stress oxydants générés persistent plus longtemps. Le lien entre le stress oxydant et l'altération des télomères reste toujours à être démontré dans la MPOC.<sup>411</sup>

### **Études 2 et 3 (chapitre 4-5)**

L'atrophie musculaire périphérique est un problème fréquent dans la MPOC et affecte négativement les patients atteints. L'incroyable plasticité du tissu musculaire est en grande partie attribuable aux cellules satellites qui sont responsables de la régénération et du maintien de la masse musculaire au cours de la vie adulte. Une altération de leur nombre, de leur capacité à s'activer, à proliférer, à se multiplier et à se différencier pourrait diminuer la

capacité de réparation des muscles suite à une blessure. De fait, dans les études du chapitre 4 et 5 nous avons voulu vérifier si les cellules satellites des sujets ayant une MPOC étaient toujours aptes à réparer le tissu endommagé. Dans l'étude du chapitre 5, nous avons en plus voulu étudier si en réponse à un entraînement en résistance, les cellules satellites répondaient adéquatement et si la myostatine pouvait contribuer à l'atténuation de la réponse observée chez les patients ayant une MPOC.

Est-ce qu'il y a suffisamment de cellules satellites pour réparer le tissu musculaire?

Bien que les télomères d'une partie des cellules satellites puissent être trop courts, la question demeurait à savoir si les cellules restantes sont aptes à participer à la régénération musculaire. Les chapitres 3, 4, 5 et 6 cherchaient à vérifier si le tissu musculaire des patients ayant une MPOC contenait autant de cellules satellites et si les cellules satellites du quadriceps et du diaphragme présentes étaient toujours aptes à proliférer et à se différencier en cellules musculaires. Dans les différents chapitres, ayant chacun des groupes distincts de patients avec une MPOC et de sujets ayant des fonctions respiratoires normales, nous avons établi que le nombre de cellules satellites reste constant indépendamment de la fonction pulmonaire, de la surface de cuisse et du groupe musculaire étudié. Dans la littérature, il est connu que le nombre de cellules satellites est affecté par l'âge, c'est-à-dire qu'il y a une diminution de leur nombre en fonction de l'âge, mais que ce déclin n'est observé qu'à partir de 70 ans.<sup>412</sup> Nos résultats suggèrent également qu'une maladie chronique n'affecte pas le nombre de cellules satellites présentes dans les muscles squelettiques. Dans les différentes études présentées dans cette thèse, indépendamment des facteurs précédemment cités, le nombre de cellules satellites est comparable entre les différentes populations.

Est-ce que les cellules satellites présentes sont toujours aptes à régénérer le muscle?

Dans le chapitre 5, une augmentation des noyaux centraux au repos et suite à la séance d'entraînement chez les patients ayant une MPOC a été mesurée. Nos résultats suggèrent aussi que les cellules satellites, dans les muscles des sujets ayant une MPOC, ne s'activent pas et/ou ont une activation retardée comparativement aux sujets ayant une fonction pulmonaire normale. Au repos, l'expression de plusieurs gènes impliqués dans la myogenèse est augmentée tandis que l'expression de différents gènes impliqués dans la voie de la myostatine est diminuée chez les patients ayant une MPOC. Nos données obtenues avec les cellules musculaires en culture démontrent que le processus de myogenèse est déficient résultant en une diminution de l'accumulation de la chaîne lourde de myosine.

Le nombre de noyaux centraux est systématiquement augmenté dans les muscles squelettiques des patients ayant une MPOC au cours du développement de la maladie, jusqu'à ce qu'il y ait présence d'atrophie musculaire et sénescence répllicative. Le tissu musculaire de patient ayant une MPOC semble être plus fragile et les dommages musculaires sont plus abondants comme suggéré par la mesure indirecte des noyaux centraux. La cause de cette fragilité des fibres musculaires est cependant méconnue. Une piste de solution provient des changements morphologiques ayant cours dans le tissu musculaire durant le développement et la progression de la maladie. Ces modifications semblent affecter la structure même du muscle. Outre la transition des fibres oxydatives vers les fibres glycolytiques, la diminution de la capillarisation et d'autres changements structurels ont probablement lieu dans les muscles <sup>143</sup> le rendant plus susceptible aux dommages. La cause principale de ces changements est l'inactivité.

Les changements structuraux et morphologiques observés dans le muscle squelettique des sujets ayant une MPOC se rapprochent de ceux observés lors du vieillissement. Les adaptations des muscles squelettiques au vieillissement sont : une diminution de la masse, de la force et de l'endurance. Les muscles vieillissants comptent moins de fibres, elles sont

souvent atrophiées et elles sont plus susceptibles aux dommages.<sup>413;414</sup> Le vieillissement affecte également l'efficacité de la régénération tissulaire et le nombre de cellules satellites. Avec l'âge, les fibres des muscles squelettiques sont remplacées moins souvent et la réponse inflammatoire est souvent prolongée.<sup>415</sup> L'environnement systémique semble jouer un rôle prépondérant dans l'atténuation de la régénération musculaire avec l'âge. Lorsque des muscles blessés sont greffés dans des environnements jeunes ou lorsque des animaux âgés sont en pairage parabiotique avec des souris jeunes, les muscles retrouvent leurs capacités à se régénérer via l'activation des cellules satellites.<sup>345;416;417</sup> Ces résultats suggèrent que les cellules satellites ne perdent pas leur potentiel de régénération, mais que l'environnement observé avec l'âge est néfaste pour leurs activités. Certaines études émettent une nuance sur ces résultats, en suggérant que l'environnement joue un rôle important, mais que les cellules satellites perdent une partie de leur potentiel de régénération. Suite à l'induction d'une blessure chez des souris âgées, on observe une régénération atténuée comparativement à des souris jeunes. De plus, lorsque les cellules satellites sont isolées des souris âgées et mises en culture on observe une diminution du nombre de colonies produites et une diminution du nombre de myoblastes matures et de myotubes. On peut alors se demander si l'environnement systémique des patients ayant une MPOC ne pourrait pas aussi nuire à l'activité des cellules satellites. À la vue des résultats des chapitres 5, 6 et 7, les cellules satellites semblent avoir une réponse altérée suite à un stimulus (entraînement en résistance), leurs activations sont retardées, et au final, elles accumulent moins de chaînes lourdes de myosine par une altération au niveau de la myogenèse. Même si on compare sur papier des sujets ayant un âge similaire, on peut se demander si on compare des sujets ayant un âge physiologique similaire. Une maladie chronique, telle la MPOC, peut accélérer le déclin des fonctions biologiques par l'augmentation des cellules sénescents de tous types cellulaires<sup>418-420</sup> y compris le tissu musculaire.<sup>411</sup> Les adaptations observées dans la MPOC seraient en quelque sorte un



déclin prématuré des fonctions biologiques des différents organes comme celles observées lors du vieillissement.

#### **Étude 4 (chapitre 6)**

Dans ce chapitre, nous avons voulu vérifier le rôle des cellules satellites et de la régénération musculaire dans deux muscles différents subissant des adaptations distinctes de la maladie. D'une part le diaphragme a une activité plus élevée par l'augmentation de la demande respiratoire et d'une autre part, le quadriceps voit son activité diminuer au fur et à mesure que la maladie progresse et que la sédentarité s'installe.<sup>143</sup> La comparaison morphologique et physiologique entre ces deux groupes musculaires et l'implication des facteurs locaux et systémiques chez un même patient devient donc très intéressante. Plus spécifiquement, nous avons voulu comparer l'implication des cellules satellites du diaphragme et du quadriceps dans l'adaptation de ces muscles à la maladie. Nous avons également voulu étudier si les cellules satellites étaient aptes à s'activer, à proliférer, à se multiplier et à se différencier normalement autant dans le diaphragme que dans le *vastus lateralis*. De plus, nous avons voulu étudier si les  $\beta$ 2-agonistes, des molécules hypertrophiantes largement utilisées dans le traitement de la MPOC, pouvaient avoir un impact sur les cellules satellites.

Est-ce que la MPOC affecte autant les muscles respiratoires que les muscles périphériques?

Si la littérature sur la régénération musculaire dans la MPOC est peu abondante dans les muscles périphériques, elle est quasi absente dans le diaphragme. Par contre, il est intéressant de comparer ces deux groupes musculaires puisqu'ils ont des niveaux d'activité très différents. Dans la MPOC, le diaphragme voit son niveau d'activité augmenté dû à la demande respiratoire accrue tandis que le muscle périphérique voit son niveau d'activité diminué en raison de la spirale de déconditionnement.<sup>143</sup> Une augmentation des noyaux centraux dans le diaphragme et dans le quadriceps

de patients ayant une MPOC comparativement à des sujets ayant une fonction respiratoire normale a été observée. Cette augmentation des dommages coïncide avec une augmentation des différents facteurs impliqués dans la myogenèse. Les résultats obtenus avec les quadriceps sont à prendre avec un bémol. On n'observe aucune modulation dans l'expression des différents ARNm autres que les E3 ligases suggérant que l'inactivité avant, durant et après la chirurgie thoracique serait responsable de l'absence de modulation des facteurs régulant la myogenèse. Une des limitations majeures de cette étude est que la biopsie du quadriceps a toujours été faite en salle de réveil plusieurs heures après la chirurgie thoracique. Il faut savoir que les différents ARNm régulant la myogenèse sont transcrits et dégradés rapidement. Par exemple, en réponse à un entraînement en résistance, on observe une augmentation de MyoD quatre heures après la séance d'entraînement et un retour au niveau basal huit heures après.<sup>421</sup> Dans notre étude, la biopsie du quadriceps était faite au minimum 6 heures après l'entrée en chirurgie thoracique, 6 heures pendant lesquelles le patient était alité et complètement inactif. Cette inactivité peut expliquer l'absence de variation en ARNm des différents facteurs impliqués dans la myogenèse. Par contre, il est intéressant de noter que l'expression de tous ces facteurs est significativement augmentée dans le diaphragme des patients ayant une MPOC. Puisque la MPOC requiert une demande respiratoire exagérée, les dommages y sont plus abondants et la demande envers les cellules satellites est augmentée. Malheureusement, à cause de la limitation majeure de l'étude, on ne peut comparer la régénération musculaire dans les deux groupes musculaires. Il faudra considérer le délai entre les deux biopsies pour la conception des prochaines études.

### **Étude 5 (chapitre 7)**

Il n'existe pas d'évidences sur le fait que l'inflammation pulmonaire soit capable de se propager au reste de l'organisme et d'agir localement dans les muscles périphériques. L'identification de facteurs inflammatoires induits par

la maladie et capables d'agir sur l'intégrité des protéines contractiles est nécessaire. SAA1, une cytokine exprimée en phase aiguë pourrait être une de celles-ci tandis que p21 pourrait contrôler son expression. SAA1 a récemment été rapportée comme jouant un rôle dans la dégradation protéique pouvant contribuer à la cachexie.<sup>159;422</sup> Nos résultats démontrent une surexpression de l'ARNm de SAA1 et p21 dans le quadriceps des patients atteints de MPOC. De plus, nous avons montré que SAA1 est d'autant plus induit chez les patients ayant une exarcebation de leur MPOC. Fait intéressant, SAA1 a été associé à plusieurs maladies inflammatoires et aux infections virales, incluant les infections respiratoires<sup>403;423;424</sup> tandis que p21 s'est révélé comme étant une protéine pouvant contrôler l'inflammation, lorsque surexprimée dans les articulations atteintes d'arthrite expérimentale.<sup>425</sup> Il est d'une importance capitale de déterminer le rôle spécifique de SAA1 et p21 sur les voies de signalisation responsable de la dégradation des protéines musculaires dans le contexte de la MPOC.

#### Est-ce que le SAA1 et p21 jouent un rôle important dans la dysfonction des muscles périphérique dans la MPOC?

Nos résultats préliminaires suggèrent que SAA1 est bel et bien capable d'agir directement et indirectement sur l'intégrité des protéines musculaires en induisant l'expression des E3-ligases et des cytokines inflammatoires. Tandis que p21, une protéine bien connue pour réguler le cycle cellulaire pourrait aussi jouer un rôle dans le contrôle de l'inflammation. Il est suspecté que dans la MPOC l'inflammation systémique proviendrait de l'inflammation pulmonaire par le transit d'éléments pro-inflammatoires des poumons jusqu'à la circulation systémique. Il est possible que ces éléments puissent rendre l'environnement inadéquat pour conserver l'intégrité du tissu musculaire.<sup>426</sup> À cet effet, le rôle précis de la protéine SAA1 demeure hypothétique et en combinaison avec IL-6, ces protéines pourraient induire une réponse compatible avec l'atrophie musculaire via la voie de Jak/Stat.<sup>159</sup> IL-6 fait partie des cytokines qui agissent via la voie de Jak2 qui conduit au

recrutement et l'activation de Stat3.<sup>427</sup> Stat3 se charge par la suite de la transcription de différents gènes impliqués dans les processus de la prolifération, de l'apoptose, de l'inflammation et de la réponse immune.<sup>428</sup> Plusieurs études ont démontré que Stat3 est le principal facteur de transcription responsable de l'augmentation de SAA1 et de CRP en empruntant la même voie que l'IL-6 durant l'inflammation.<sup>429;430</sup> Stat3 agit sur le promoteur de SAA1 via la formation d'un complexe contenant Stat3, NF-κB p65 et p300, ce qui contribue à l'augmentation de l'expression de SAA1.<sup>431;432</sup> Nous avons démontré que l'ajout de SAA1 recombinante est capable d'induire la dégradation des protéines musculaires en plus de stimuler l'expression d'autres cytokines comme l'IL-1β, l'IL-6 et le TNF toutes capables d'induire la dégradation des protéines musculaires. D'autres part, la surexpression de p21 est capable d'atténuer l'induction de ces dites cytokines dans les articulations atteintes d'arthrite expérimentale. Dans notre modèle, l'absence de p21 en présence d'un stimulus inflammatoire induit l'expression des cytokines et conduit à l'augmentation des différentes E3 ligases (Atrogin, MuRF et Nedd4). Par ailleurs, l'ajout de plasma provenant de sujet ayant une MPOC est capable d'induire l'expression de ces mêmes facteurs. Il est maintenant établi que l'environnement systémique spécifique à la MPOC est néfaste pour l'homéostasie des protéines musculaires. Il reste beaucoup de travail à faire sur ce dernier chapitre, mais les résultats obtenus jusqu'à présent permettent d'affirmer que la MPOC est une maladie systémique et que des facteurs, dont SAA1, sont capables d'induire une cascade d'événements conduisant à la dégradation des protéines musculaires observée dans les muscles des patients ayant une MPOC.

Est-ce que les cellules satellites sont une cible de choix pour le traitement de l'atrophie musculaire dans la MPOC?

La réponse à cette question provient des études faites dans la DMD. Une thérapie prometteuse implique les cellules satellites et leurs propriétés d'être abondantes, accessibles avec un fort potentiel de prolifération.

L'utilisation thérapeutique des cellules satellites est cependant dans ses balbutiements et plusieurs obstacles restent à franchir avant d'en arriver à un traitement dans les maladies dégénératives. La greffe de myoblastes est une des méthodes potentielles d'utilisation thérapeutique des cellules satellites. Comme tout traitement, elle est sujette à des effets secondaires et son efficacité est limitée par différents facteurs.<sup>433</sup> Premièrement, la fusion des myoblastes injectés est conditionnelle à un bris des fibres musculaires.<sup>433</sup> Il faut donc trouver une façon de causer un bris musculaire en greffant les cellules, sans toutefois détruire complètement le tissu. De plus, la migration des myoblastes est limitée dans le muscle.<sup>433</sup> En effet, une fois greffées, les cellules ont tendance à rester sur place. Cette localisation est problématique, car elle force l'administration de plusieurs injections dans un même muscle.<sup>433</sup> Ainsi, le muscle est injecté à des distances avoisinant le millimètre rendant l'intervention plus difficile et invasive. De plus, la plupart des cellules injectées, entre 50% et 70%, ne survivent pas à cette procédure.<sup>434</sup> Tant que ces problèmes ne seront pas résolus, l'injection thérapeutique de cellules satellites pour augmenter la masse musculaire des patients atteints restera en phase de développement. Par contre, l'idée de pouvoir offrir un jour ce traitement à des patients ayant une MPOC et une faible masse musculaire est très attrayante.

#### Est-ce que des molécules thérapeutiques favorisant l'activité des cellules satellites pourraient traiter l'atrophie musculaire dans la MPOC?

La molécule ayant un fort potentiel et la plus susceptible d'être commercialisée dans un avenir rapproché est celle inhibant la voie de la myostatine. Premièrement, la myostatine est une protéine spécifique au muscle ce qui limite énormément les effets secondaires sur les autres organes.<sup>435</sup> Les animaux ayant une délétion génétique du gène et n'ayant pas de myostatine développent une très forte musculature démontrant l'intérêt de bloquer son activité.<sup>435</sup> Pour l'instant, les molécules à l'essai agissent surtout en bloquant l'interaction de la myostatine à son récepteur.<sup>435</sup>

On retrouve peu de littérature sur ces molécules, mais plusieurs essais cliniques sont actuellement en cours dans diverses pathologies comme la cachexie, la dystrophie, la sarcopénie et la MPOC.<sup>435</sup> Le nom des molécules, le mode d'action et les résultats ne sont pas disponibles sans doute en raison des brevets associés, mais il n'en reste pas moins que le potentiel thérapeutique est présent et permet la prise de masse musculaire par hypertrophie et hyperplasie.

## **CHAPITRE IX**

### **CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES**

## Chapitre 9: Conclusions et Perspectives

Les patients atteints de maladies chroniques comme la MPOC sont aux prises avec plusieurs manifestations systémiques liées à la progression de l'affection primaire. L'atrophie musculaire est une manifestation fréquente affectant de façon significative le parcours clinique des patients atteints.

Mes travaux de doctorat ont permis de fournir des éléments qui bonifient les connaissances sur le sujet de la dysfonction musculaire associée à la MPOC. En effet, dans les dernières années, mes travaux ont démontré que:

1. Les muscles squelettiques des patients ayant une MPOC subissent un raccourcissement prématuré de leurs télomères.
2. Les cellules satellites ne sont plus aptes à exécuter la myogenèse (prolifération et différenciation) correctement.
3. En réponse à un exercice, les cellules satellites dans le tissu musculaire des sujets ayant une MPOC ne répondent pas adéquatement.
4. La capacité de régénération du diaphragme n'est pas épuisée chez les sujets ayant une MPOC malgré la demande respiratoire augmentée et le remodelage en cours.
5. Des cytokines émanant des poumons sont capables d'induire une inflammation musculaire ce qui accentue la dégradation des protéines contractiles.

Il est maintenant évident que les cellules satellites et les processus de régénération musculaires sont déficients dans les muscles des patients ayant une MPOC. Plus particulièrement, il semblerait que les muscles des sujets ayant une MPOC contiennent plus de cellules sénescents, que leurs cellules satellites restantes ont un programme myogénique déficient et qu'elles ne



s'activent pas correctement ou pas assez rapidement suite à un stimulus. D'une part, il est connu que les voies régulant la prolifération (Notch) et la différenciation (Wnt) des cellules satellites sont affectées par le vieillissement. Il serait intéressant d'étudier en profondeur ces sentiers des signalisations dans la MPOC puisqu'on observe une augmentation de la sénescence dans le tissu musculaire. Étudier les télomères dans le diaphragme est une autre piste intéressante étant donné son niveau d'activation élevé chez les patients ayant une MPOC. D'autre part, il semble que les changements physiologiques dans le tissu musculaire ont induit une modification de l'environnement musculaire. Il serait intéressant d'étudier si ces modifications ne seraient pas responsables de la diminution de la réponse des cellules satellites. Par exemple, une augmentation de la fibrose musculaire et/ou une augmentation des tissus conjonctifs empêchant les cellules satellites de recevoir les signaux externes sont possibles dans la MPOC. D'autre part, la MPOC induit des changements au niveau systémique. Certains facteurs en circulation chez les sujets ayant une MPOC en plus des facteurs locaux ont un impact négatif sur la régénération tissulaire.

Un des facteurs qui pourrait être important dans le développement de la dysfonction des muscles périphériques dans la MPOC est SAA1. Nous pensons que ce facteur peut jouer un rôle important dans le transit de la réponse inflammatoire pulmonaire vers le tissu musculaire. L'expression de SAA1 qui est augmentée dans le quadriceps de patients ayant une MPOC pourrait agir sur les voies de signalisation cellulaire impliquées dans la dégradation protéique et l'altération de la myogenèse. Les résultats de la dernière étude sont très prometteurs et m'apparaissent être une des directions à emprunter. Il est démontré l'existence de molécules dans la circulation sanguine capable de déstabiliser l'homéostasie des protéines musculaires tel SAA1. De plus, cette étude démontre que p21 est un acteur du cycle cellulaire capable de réguler l'inflammation et possiblement la signalisation de SAA1. Ces molécules font le lien entre l'affection primaire et les différentes comorbidités.

Par contre, l'inactivité physique et la sédentarité sont peut-être le point le plus important à considérer non seulement dans la MPOC, mais aussi dans toutes autres maladies chroniques. La littérature abonde de données qui s'apparentent aux données dans la MPOC, tant au niveau systémique, musculaire que cardiovasculaire, incriminant l'inactivité physique comme cause première des dysfonctionnements métaboliques et signalétiques chez l'humain. Au-delà de l'atteinte primaire aux poumons, de l'inflammation systémique, du traitement pharmacologique et du stress oxydant, c'est le bas niveau d'activité physique qui amène les plus grandes détériorations physiologiques dans la MPOC en plus du déconditionnement des cellules satellites.

La compréhension de ces mécanismes est essentielle pour modéliser une approche thérapeutique efficace et cohérente avec le portrait physiopathologique de l'individu. Par ailleurs, une transposition de connaissances accumulées vers d'autres pathologies où l'atrophie musculaire est importante (cancer, insuffisance cardiaque ou rénale, etc.) est envisageable en raison de leur nature inflammatoire et de leur caractère systémique. Il n'en reste pas moins que les cellules satellites ont un potentiel thérapeutique formidable pour la prise de masse musculaire.

## Bibliographie

1. Gerard J. Tortora and Bryan Derrickson. 1994. Principes d'anatomie et de physiologie, 11e édition ed. -1376.
2. Health Canada. Respiratory Disease in Canada. 2001. 6-11-2009.
3. Hawke, T. J. and D. J. Garry. 2001. Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology. *J. Appl. Physiol* 91:534-551.
4. American Thoracic Society and European Respiratory Society. Standards for the diagnosis and treatment of patients with chronic obstructive pulmonary disease. 2004. 6-11-0090.
5. Barnes, P. J. 2000. Chronic obstructive pulmonary disease. *N. Engl. J. Med.* 343:269-280.
6. Mostert, R., A. Goris, C. Weling-Scheepers, E. F. Wouters, and A. M. Schols. 2000. Tissue depletion and health related quality of life in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Respir. Med.* 94:859-867.
7. O'Donnell, D. E., S. Aaron, J. Bourbeau, P. Hernandez, D. D. Marciniuk, M. Balter, G. Ford, A. Gervais, R. Goldstein, R. Hodder, A. Kaplan, S. Keenan, Y. Lacasse, F. Maltais, J. Road, G. Rocker, D. Sin, T. Sinuff, and N. Voduc. 2007. Canadian Thoracic Society recommendations for management of chronic obstructive pulmonary disease - 2007 update. *Can. Respir. J.* 14 Suppl B:5B-32B.
8. Buist, A. S., M. A. McBurnie, W. M. Vollmer, S. Gillespie, P. Burney, D. M. Mannino, A. M. Menezes, S. D. Sullivan, T. A. Lee, K. B. Weiss, R. L. Jensen, G. B. Marks, A. Gulsvik, and E. Nizankowska-Mogilnicka. 2007. International variation in the prevalence of COPD (the BOLD Study): a population-based prevalence study. *Lancet* 370:741-750.
9. Murray, C. J. and A. D. Lopez. 1997. Alternative projections of mortality and disability by cause 1990-2020: Global Burden of Disease Study. *Lancet* 349:1498-1504.
10. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD). Global Strategy for the Diagnosis, Management and Prevention of COPD. 2008. 6-11-0090.
11. World Health Organization. *WHO Report on the Global Tobacco Epidemic, 2008: The MPOWER package.* 2008. 6-12-0090.
12. Laviolette, L., Y. Lacasse, M. Doucet, M. Lacasse, K. Marquis, D. Saey, P. LeBlanc, and F. Maltais. 2007. Chronic obstructive pulmonary disease in women. *Can. Respir. J.* 14:93-98.
13. Health Canada. Economic Burden of Illness in Canada, 1998. 2002.
14. Mayer, A. S. and L. S. Newman. 2001. Genetic and environmental modulation of chronic obstructive pulmonary disease. *Respir. Physiol* 128:3-11.
15. Mannino, D. M. 2002. COPD: epidemiology, prevalence, morbidity and mortality, and disease heterogeneity. *Chest* 121:121S-126S.

16. Kalsheker, N. and S. Chappell. 2008. The new genetics and chronic obstructive pulmonary disease. *COPD*. 5:257-264.
17. Lieberman, J., B. Winter, and A. Sastre. 1986. Alpha 1-antitrypsin Pi-types in 965 COPD patients. *Chest* 89:370-373.
18. de Serres, F. J., I. Blanco, and E. Fernandez-Bustillo. 2006. Estimating the risk for alpha-1 antitrypsin deficiency among COPD patients: evidence supporting targeted screening. *COPD*. 3:133-139.
19. Schellenberg, D., P. D. Pare, T. D. Weir, J. J. Spinelli, B. A. Walker, and A. J. Sandford. 1998. Vitamin D binding protein variants and the risk of COPD. *Am.J.Respir.Crit Care Med*. 157:957-961.
20. Cohen, B. H. 1980. Chronic obstructive pulmonary disease: a challenge in genetic epidemiology. *Am.J.Epidemiol*. 112:274-288.
21. Harju, T., W. Mazur, H. Merikallio, Y. Soini, and V. L. Kinnula. 2008. Glutathione-S-transferases in lung and sputum specimens, effects of smoking and COPD severity. *Respir.Res*. 9:80.
22. Molfino, N. A. 2007. Genetic predisposition to accelerated decline of lung function in COPD. *Int.J.Chron.Obstruct.Pulmon.Dis*. 2:117-119.
23. Gingo, M. R., L. J. Silveira, Y. E. Miller, A. L. Friedlander, G. P. Cosgrove, E. D. Chan, L. A. Maier, and R. P. Bowler. 2008. Tumour necrosis factor gene polymorphisms are associated with COPD. *Eur.Respir.J*. 31:1005-1012.
24. Kim, K. M., S. H. Park, J. S. Kim, W. K. Lee, S. I. Cha, C. H. Kim, Y. M. Kang, T. H. Jung, I. S. Kim, and J. Y. Park. 2008. Polymorphisms in the type IV collagen alpha3 gene and the risk of COPD. *Eur.Respir.J*. 32:35-41.
25. Pierrou, S., P. Broberg, R. A. O'Donnell, K. Pawlowski, R. Virtala, E. Lindqvist, A. Richter, S. J. Wilson, G. Angco, S. Moller, H. Bergstrand, W. Koopmann, E. Wieslander, P. E. Stromstedt, S. T. Holgate, D. E. Davies, J. Lund, and R. Djukanovic. 2007. Expression of genes involved in oxidative stress responses in airway epithelial cells of smokers with chronic obstructive pulmonary disease. *Am.J.Respir.Crit Care Med*. 175:577-586.
26. Malhotra, D., R. Thimmulappa, A. Navas-Acien, A. Sandford, M. Elliott, A. Singh, L. Chen, X. Zhuang, J. Hogg, P. Pare, R. M. Tudor, and S. Biswal. 2008. Decline in NRF2-regulated antioxidants in chronic obstructive pulmonary disease lungs due to loss of its positive regulator, DJ-1. *Am.J.Respir.Crit Care Med*. 178:592-604.
27. Prescott, E., A. M. Bjerg, P. K. Andersen, P. Lange, and J. Vestbo. 1997. Gender difference in smoking effects on lung function and risk of hospitalization for COPD: results from a Danish longitudinal population study. *Eur.Respir.J*. 10:822-827.
28. Leynaert, B., J. Bousquet, C. Henry, R. Liard, and F. Neukirch. 1997. Is bronchial hyperresponsiveness more frequent in women than in men? A population-based study. *Am.J.Respir.Crit Care Med*. 156:1413-1420.

29. Kirkpatrick, P. and M. T. Dransfield. 2009. Racial and sex differences in chronic obstructive pulmonary disease susceptibility, diagnosis, and treatment. *Curr.Opin.Pulm.Med.* 15:100-104.
30. Watson, L., J. Vestbo, D. S. Postma, M. Decramer, S. Rennard, V. A. Kiri, P. A. Vermeire, and J. B. Soriano. 2004. Gender differences in the management and experience of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Respir.Med.* 98:1207-1213.
31. de Torres, J. P., C. Casanova, C. Hernandez, J. Abreu, A. guirre-Jaime, and B. R. Celli. 2005. Gender and COPD in patients attending a pulmonary clinic. *Chest* 128:2012-2016.
32. Leynaert, B., J. Bousquet, C. Henry, R. Liard, and F. Neukirch. 1997. Is bronchial hyperresponsiveness more frequent in women than in men? A population-based study. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 156:1413-1420.
33. Talhout, R., T. Schulz, E. Florek, B. J. van, P. Wester, and A. Opperhuizen. 2011. Hazardous compounds in tobacco smoke. *Int.J.Enviro.Res Public Health* 8:613-628.
34. Devereux, G. 2006. ABC of chronic obstructive pulmonary disease. Definition, epidemiology, and risk factors. *BMJ* 332:1142-1144.
35. Pope, C. A., III, R. T. Burnett, M. J. Thun, E. E. Calle, D. Krewski, K. Ito, and G. D. Thurston. 2002. Lung cancer, cardiopulmonary mortality, and long-term exposure to fine particulate air pollution. *JAMA* 287:1132-1141.
36. Gryparis, A., B. Forsberg, K. Katsouyanni, A. Analitis, G. Touloumi, J. Schwartz, E. Samoli, S. Medina, H. R. Anderson, E. M. Niciu, H. E. Wichmann, B. Kriz, M. Kosnik, J. Skorkovsky, J. M. Vonk, and Z. Dortbudak. 2004. Acute effects of ozone on mortality from the "air pollution and health: a European approach" project. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 170:1080-1087.
37. Hoek, G., B. Brunekreef, S. Goldbohm, P. Fischer, and P. A. van den Brandt. 2002. Association between mortality and indicators of traffic-related air pollution in the Netherlands: a cohort study. *Lancet* 360:1203-1209.
38. Xu, F., X. Yin, M. Zhang, H. Shen, L. Lu, and Y. Xu. 2005. Prevalence of physician-diagnosed COPD and its association with smoking among urban and rural residents in regional mainland China. *Chest* 128:2818-2823.
39. Balmes, J. R. 2002. Occupational airways diseases from chronic low-level exposures to irritants. *Clin.Chest Med.* 23:727-35, vi.
40. Boschetto, P., S. Quintavalle, D. Miotto, C. N. Lo, E. Zeni, and C. E. Mapp. 2006. Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and occupational exposures. *J.Occup.Med.Toxicol.* 1:11.
41. 2003. American Thoracic Society/European Respiratory Society statement: standards for the diagnosis and management of individuals with alpha-1 antitrypsin deficiency. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 168:818-900.

42. Pauwels, R. A., A. S. Buist, P. Ma, C. R. Jenkins, and S. S. Hurd. 2001. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease: National Heart, Lung, and Blood Institute and World Health Organization Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD): executive summary. *Respir.Care* 46:798-825.
43. Saetta, M. 1998. [Mechanisms of bronchial obstruction in COPD and emphysema: from anatomopathology to respiratory function]. *Rev.Mal Respir.* 15 Suppl 2:S17-S19.
44. Jagoe, R. T. and M. P. Engelen. 2003. Muscle wasting and changes in muscle protein metabolism in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur.Respir.J.Suppl* 46:52s-63s.
45. O'Shaughnessy, T. C., T. W. Ansari, N. C. Barnes, and P. K. Jeffery. 1997. Inflammation in bronchial biopsies of subjects with chronic bronchitis: inverse relationship of CD8+ T lymphocytes with FEV1. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 155:852-857.
46. Tetley, T. D. 2005. Inflammatory cells and chronic obstructive pulmonary disease. *Curr.Drug Targets.Inflamm.Allergy* 4:607-618.
47. Di, S. A., G. Caramori, F. L. Ricciardolo, A. Capelli, I. M. Adcock, and C. F. Donner. 2004. Cellular and molecular mechanisms in chronic obstructive pulmonary disease: an overview. *Clin.Exp.Allergy* 34:1156-1167.
48. Chung, K. F. 2001. Cytokines in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur.Respir.J.Suppl* 34:50s-59s.
49. Miller, L. M., W. M. Foster, D. M. Dambach, D. Doebler, M. McKinnon, L. Killar, and M. Longphre. 2002. A murine model of cigarette smoke-induced pulmonary inflammation using intranasally administered smoke-conditioned medium. *Exp.Lung Res.* 28:435-455.
50. Churg, A., J. Dai, H. Tai, C. Xie, and J. L. Wright. 2002. Tumor necrosis factor-alpha is central to acute cigarette smoke-induced inflammation and connective tissue breakdown. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 166:849-854.
51. Puljic, R. and A. Pahl. 2004. Smoke induced changes in epithelial cell gene expression: development of an in vitro model for COPD. *ALTEX.* 21:3-7.
52. Wouters, E. F., K. H. Groenewegen, M. A. Dentener, and J. H. Vernooy. 2007. Systemic inflammation in chronic obstructive pulmonary disease: the role of exacerbations. *Proc.Am.Thorac.Soc.* 4:626-634.
53. Wedzicha, J. A., T. A. Seemungal, P. K. Maccallum, E. A. Paul, G. C. Donaldson, A. Bhowmik, D. J. Jeffries, and T. W. Meade. 2000. Acute exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease are accompanied by elevations of plasma fibrinogen and serum IL-6 levels. *Thromb.Haemost.* 84:210-215.
54. Benigni, F., G. Fantuzzi, S. Sacco, M. Sironi, P. Pozzi, C. A. Dinarello, J. D. Sipe, V. Poli, M. Cappelletti, G. Paonessa, D. Pennica, N. Panayotatos, and P. Ghezzi. 1996. Six different cytokines that share

- GP130 as a receptor subunit, induce serum amyloid A and potentiate the induction of interleukin-6 and the activation of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis by interleukin-1. *Blood* 87:1851-1854.
55. Debigare, R., F. Maltais, C. H. Cote, A. Michaud, M. A. Caron, M. Mofarrah, P. LeBlanc, and S. N. Hussain. 2008. Profiling of mRNA expression in quadriceps of patients with COPD and muscle wasting. *COPD*. 5:75-84.
  56. Di Francia, M., D. Barbier, J. L. Mege, and J. Orehek. 1994. Tumor necrosis factor-alpha levels and weight loss in chronic obstructive pulmonary disease. *Am.J.Respir.Crit.Care Med.* 150:1453-1455.
  57. Takabatake, N., H. Nakamura, S. Abe, S. Inoue, T. Hino, H. Saito, H. Yuki, S. Kato, and H. Tomoike. 2000. The relationship between chronic hypoxemia and activation of the tumor necrosis factor-alpha system in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 161:1179-1184.
  58. Tracey, K. J., H. Wei, K. R. Manogue, Y. Fong, D. G. Hesse, H. T. Nguyen, G. C. Kuo, B. Beutler, R. S. Cotran, and A. Cerami. 1988. Cachectin/tumor necrosis factor induces cachexia, anemia, and inflammation. *J.Exp.Med.* 167:1211-1227.
  59. Tetley, T. D. 2002. Macrophages and the pathogenesis of COPD. *Chest* 121:156S-159S.
  60. Donaldson, G. C., T. A. Seemungal, I. S. Patel, A. Bhowmik, T. M. Wilkinson, J. R. Hurst, P. K. Maccallum, and J. A. Wedzicha. 2005. Airway and systemic inflammation and decline in lung function in patients with COPD. *Chest* 128:1995-2004.
  61. de Serres, F. J., I. Blanco, and E. Fernandez-Bustillo. 2006. Estimating the risk for alpha-1 antitrypsin deficiency among COPD patients: evidence supporting targeted screening. *COPD*. 3:133-139.
  62. de Serres, F. J., I. Blanco, and E. Fernandez-Bustillo. 2006. Estimating the risk for alpha-1 antitrypsin deficiency among COPD patients: evidence supporting targeted screening. *COPD*. 3:133-139.
  63. Kodavanti, U. P., M. C. Jackson, A. D. Ledbetter, B. C. Starcher, P. A. Evansky, A. Harewood, D. W. Winsett, and D. L. Costa. 2000. The combination of elastase and sulfur dioxide exposure causes COPD-like lesions in the rat. *Chest* 117:299S-302S.
  64. Di, S. A., G. Caramori, F. L. Ricciardolo, A. Capelli, I. M. Adcock, and C. F. Donner. 2004. Cellular and molecular mechanisms in chronic obstructive pulmonary disease: an overview. *Clin.Exp.Allergy* 34:1156-1167.
  65. Sharafkhaneh, A., N. A. Hanania, and V. Kim. 2008. Pathogenesis of emphysema: from the bench to the bedside. *Proc.Am.Thorac.Soc.* 5:475-477.
  66. Stanescu, D., A. Sanna, C. Veriter, S. Kostianev, P. G. Calcagni, L. M. Fabbri, and P. Maestrelli. 1996. Airways obstruction, chronic expectoration, and rapid decline of FEV1 in smokers are associated with increased levels of sputum neutrophils. *Thorax* 51:267-271.

67. Lowrey, G. E., N. Henderson, J. D. Blakey, J. M. Corne, and S. R. Johnson. 2008. MMP-9 protein level does not reflect overall MMP activity in the airways of patients with COPD. *Respir.Med.* 102:845-851.
68. Imai, K., S. S. Dalal, E. S. Chen, R. Downey, L. L. Schulman, M. Ginsburg, and J. D'Armiento. 2001. Human collagenase (matrix metalloproteinase-1) expression in the lungs of patients with emphysema. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 163:786-791.
69. de Serres, F. J., I. Blanco, and E. Fernandez-Bustillo. 2006. Estimating the risk for alpha-1 antitrypsin deficiency among COPD patients: evidence supporting targeted screening. *COPD.* 3:133-139.
70. Li, X., R. Shu, G. Filippatos, and B. D. Uhal. 2004. Apoptosis in lung injury and remodeling. *J.Appl.Physiol* 97:1535-1542.
71. Lundborg, M., R. Bouhafs, P. Gerde, P. Ewing, P. Camner, S. E. Dahlq, and C. Jarstrand. 2007. Aggregates of ultrafine particles modulate lipid peroxidation and bacterial killing by alveolar macrophages. *Environmental Research* 104:250-257.
72. Radi, R., J. S. Beckman, K. M. Bush, and B. A. Freeman. 1991. Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls. The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *J.Biol.Chem.* 266:4244-4250.
73. Corradi, M., P. Pignatti, P. Manini, R. Andreoli, M. Goldoni, M. Poppa, G. Moscato, B. Balbi, and A. Mutti. 2004. Comparison between exhaled and sputum oxidative stress biomarkers in chronic airway inflammation. *Eur.Respir.J.* 24:1011-1017.
74. Di, S. A., G. Turato, P. Maestrelli, C. E. Mapp, M. P. Ruggieri, A. Roggeri, P. Boschetto, L. M. Fabbri, and M. Saetta. 1996. Airflow limitation in chronic bronchitis is associated with T-lymphocyte and macrophage infiltration of the bronchial mucosa. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 153:629-632.
75. Hogg, J. C., F. Chu, S. Utokaparch, R. Woods, W. M. Elliott, L. Buzatu, R. M. Cherniack, R. M. Rogers, F. C. Scirba, H. O. Coxson, and P. D. Pare. 2004. The nature of small-airway obstruction in chronic obstructive pulmonary disease. *N.Engl.J.Med.* 350:2645-2653.
76. Retamales, I., W. M. Elliott, B. Meshi, H. O. Coxson, P. D. Pare, F. C. Scirba, R. M. Rogers, S. Hayashi, and J. C. Hogg. 2001. Amplification of inflammation in emphysema and its association with latent adenoviral infection. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 164:469-473.
77. Barbera, J. A., V. I. Peinado, and S. Santos. 2003. Pulmonary hypertension in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur.Respir.J.* 21:892-905.
78. van Schayck, C. P., P. N. Dekhuijzen, W. J. Gorgels, P. M. van Grunsven, J. Molema, C. L. van Herwaarden, and W. C. van. 1998. Are anti-oxidant and anti-inflammatory treatments effective in different subgroups of COPD? A hypothesis. *Respir.Med.* 92:1259-1264.
79. Altman, E. E. 2004. Update on COPD. Today's strategies improve quality of life. *Adv.Nurse Pract.* 12:49-54.



80. Barnes, P. J. and B. R. Celli. 2009. Systemic manifestations and comorbidities of COPD. *Eur.Respir.J.* 33:1165-1185.
81. Viegi, G., F. Pistelli, D. L. Sherrill, S. Maio, S. Baldacci, and L. Carrozzi. 2007. Definition, epidemiology and natural history of COPD. *Eur.Respir.J.* 30:993-1013.
82. Viegi, G., F. Pistelli, D. L. Sherrill, S. Maio, S. Baldacci, and L. Carrozzi. 2007. Definition, epidemiology and natural history of COPD. *Eur.Respir.J.* 30:993-1013.
83. Sin, D. D. and S. F. Man. 2005. Chronic obstructive pulmonary disease as a risk factor for cardiovascular morbidity and mortality. *Proc.Am.Thorac.Soc.* 2:8-11.
84. Anthoisen, N. R., J. E. Connett, J. P. Kiley, M. D. Altose, W. C. Bailey, A. S. Buist, W. A. J. Conway, P. L. Enright, R. E. Kanner, P. O'hara, G. R. Owens, P. D. Scanlon, D. P. Tashkin, and R. A. Wise. 1995. Effects of Smoking Intervention and the Use of an Inhaled Anticholinergic Bronchodilator on the Rate of Decline of FEV1. The Lung Health Study. *Survey of Anesthesiology* 39.
85. Sin, D. D. and S. F. Man. 2003. Why are patients with chronic obstructive pulmonary disease at increased risk of cardiovascular diseases? The potential role of systemic inflammation in chronic obstructive pulmonary disease. *Circulation* 107:1514-1519.
86. Sevenoaks, M. J. and R. A. Stockley. 2006. Chronic Obstructive Pulmonary Disease, inflammation and co-morbidity--a common inflammatory phenotype? *Respir.Res.* 7:70.
87. McMahon, M., J. Gerich, and R. Rizza. 1988. Effects of glucocorticoids on carbohydrate metabolism. *Diabetes Metab Rev.* 4:17-30.
88. Jorgensen, N. R., P. Schwarz, I. Holme, B. M. Henriksen, L. J. Petersen, and V. Backer. 2007. The prevalence of osteoporosis in patients with chronic obstructive pulmonary disease: a cross sectional study. *Respir.Med.* 101:177-185.
89. Graat-Verboom, L., M. A. Spruit, B. E. van den Borne, F. W. Smeenk, E. J. Martens, R. Lunde, and E. F. Wouters. 2009. Correlates of osteoporosis in chronic obstructive pulmonary disease: An underestimated systemic component. *Respir.Med.*
90. Debigare, R. and F. Maltais. 2008. The major limitation to exercise performance in COPD is lower limb muscle dysfunction. *J.Appl.Physiol* 105:751-753.
91. Bernard, S., P. LeBlanc, F. Whittom, G. Carrier, J. Jobin, R. Belleau, and F. Maltais. 1998. Peripheral muscle weakness in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 158:629-634.
92. Chapman, K. R., J. Bourbeau, and L. Rance. 2003. The burden of COPD in Canada: results from the Confronting COPD survey. *Respir.Med.* 97 Suppl C:S23-S31.
93. Marquis, K., R. Debigare, Y. Lacasse, P. LeBlanc, J. Jobin, G. Carrier, and F. Maltais. 2002. Midthigh muscle cross-sectional area is a better predictor of mortality than body mass index in patients with chronic

- obstructive pulmonary disease. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 166:809-813.
94. Schols, A. M., R. Broekhuizen, C. A. Weling-Scheepers, and E. F. Wouters. 2005. Body composition and mortality in chronic obstructive pulmonary disease. *Am.J.Clin.Nutr.* 82:53-59.
  95. Whittom, F., J. Jobin, P. M. Simard, P. LeBlanc, C. Simard, S. Bernard, R. Belleau, and F. Maltais. 1998. Histochemical and morphological characteristics of the *vastus lateralis* muscle in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Med.Sci.Sports Exerc.* 30:1467-1474.
  96. Maltais, F., M. J. Sullivan, P. LeBlanc, B. D. Duscha, F. H. Schachat, C. Simard, J. M. Blank, and J. Jobin. 1999. Altered expression of myosin heavy chain in the *vastus lateralis* muscle in patients with COPD. *Eur.Respir.J.* 13:850-854.
  97. Engelen, M. P., A. M. Schols, J. D. Does, and E. F. Wouters. 2000. Skeletal muscle weakness is associated with wasting of extremity fat-free mass but not with airflow obstruction in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am.J.Clin.Nutr.* 71:733-738.
  98. Bernard, S., P. LeBlanc, F. Whittom, G. Carrier, J. Jobin, R. Belleau, and F. Maltais. 1998. Peripheral muscle weakness in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 158:629-634.
  99. Gosselink, R., T. Troosters, and M. Decramer. 1996. Peripheral muscle weakness contributes to exercise limitation in COPD. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 153:976-980.
  100. Coronell, C., M. Orozco-Levi, and J. Gea. 2002. COPD and body weight in a Mediterranean population. *Clin.Nutr.* 21:437-438.
  101. Vestbo, J., E. Prescott, T. Almdal, M. Dahl, B. G. Nordestgaard, T. Andersen, T. I. Sorensen, and P. Lange. 2006. Body mass, fat-free body mass, and prognosis in patients with chronic obstructive pulmonary disease from a random population sample: findings from the Copenhagen City Heart Study. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 173:79-83.
  102. Gosselink, R., T. Troosters, and M. Decramer. 1996. Peripheral muscle weakness contributes to exercise limitation in COPD. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 153:976-980.
  103. Killian, K. J., P. Leblanc, D. H. Martin, E. Summers, N. L. Jones, and E. J. Campbell. 1992. Exercise capacity and ventilatory, circulatory, and symptom limitation in patients with chronic airflow limitation. *Am.Rev.Respir.Dis.* 146:935-940.
  104. Decramer, M., R. Gosselink, T. Troosters, M. Verschueren, and G. Evers. 1997. Muscle weakness is related to utilization of health care resources in COPD patients. *Eur.Respir.J.* 10:417-423.
  105. Kim, H. C., M. Mofarrahi, and S. N. Hussain. 2008. Skeletal muscle dysfunction in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Int.J.Chron.Obstruct.Pulmon.Dis.* 3:637-658.

106. Kim, H. C., M. Mofarrahi, and S. N. Hussain. 2008. Skeletal muscle dysfunction in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Int.J.Chron.Obstruct.Pulmon.Dis.* 3:637-658.
107. Lecker, S. H. and A. L. Goldberg. 2002. Slowing muscle atrophy: putting the brakes on protein breakdown. *J.Physiol* 545:729.
108. Gosker, H. R., B. Kubat, G. Schaart, GJ. van der Vusse, E. F. Wouters, and A. M. Schols. 2003. Myopathological features in skeletal muscle of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Eur.Respir.J.* 22:280-285.
109. Hornberger, T. A. and K. A. Esser. 2004. Mechanotransduction and the regulation of protein synthesis in skeletal muscle. *Proc.Nutr.Soc.* 63:331-335.
110. Conejo, R. and M. Lorenzo. 2001. Insulin signaling leading to proliferation, survival, and membrane ruffling in C2C12 myoblasts. *J.Cell Physiol* 187:96-108.
111. Rotwein, P. and E. M. Wilson. 2009. Distinct actions of Akt1 and Akt2 in skeletal muscle differentiation. *J.Cell Physiol* 219:503-511.
112. Ma, X. M. and J. Blenis. 2009. Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* 10:307-318.
113. Ohanna, M., A. K. Sobering, T. Lapointe, L. Lorenzo, C. Praud, E. Petroulakis, N. Sonenberg, P. A. Kelly, A. Sotiropoulos, and M. Pende. 2005. Atrophy of S6K1(-/-) skeletal muscle cells reveals distinct mTOR effectors for cell cycle and size control. *Nat.Cell Biol.* 7:286-294.
114. Glass, D. J. 2005. Skeletal muscle hypertrophy and atrophy signaling pathways. *Int.J.Biochem.Cell Biol* 37:1974-1984.
115. Schmalbruch, H. and D. M. Lewis. 2000. Dynamics of nuclei of muscle fibers and connective tissue cells in normal and denervated rat muscles. *Muscle Nerve* 23:617-626.
116. Rock, K. L., C. Gramm, L. Rothstein, K. Clark, R. Stein, L. Dick, D. Hwang, and A. L. Goldberg. 1994. Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules. *Cell* 78:761-771.
117. Lecker, S. H., R. T. Jagoe, A. Gilbert, M. Gomes, V. Baracos, J. Bailey, S. R. Price, W. E. Mitch, and A. L. Goldberg. 2004. Multiple types of skeletal muscle atrophy involve a common program of changes in gene expression. *FASEB J* 18:39-51.
118. Li, Y. P., Y. Chen, J. John, J. Moylan, B. Jin, D. L. Mann, and M. B. Reid. 2005. TNF-alpha acts via p38 MAPK to stimulate expression of the ubiquitin ligase atrogin1/MAFbx in skeletal muscle. *FASEB J.* 19:362-370.
119. Glass, D. J. 2005. Skeletal muscle hypertrophy and atrophy signaling pathways. *Int.J.Biochem.Cell Biol* 37:1974-1984.
120. Sandri, M., C. Sandri, A. Gilbert, C. Skurk, E. Calabria, A. Picard, K. Walsh, S. Schiaffino, S. H. Lecker, and A. L. Goldberg. 2004. Foxo transcription factors induce the atrophy-related ubiquitin ligase atrogin-1 and cause skeletal muscle atrophy. *Cell* 117:399-412.

121. Sandri, M., C. Sandri, A. Gilbert, C. Skurk, E. Calabria, A. Picard, K. Walsh, S. Schiaffino, S. H. Lecker, and A. L. Goldberg. 2004. Foxo transcription factors induce the atrophy-related ubiquitin ligase atrogin-1 and cause skeletal muscle atrophy. *Cell* 117:399-412.
122. Satchek, J. M., A. Ohtsuka, S. C. McLary, and A. L. Goldberg. 2004. IGF-I stimulates muscle growth by suppressing protein breakdown and expression of atrophy-related ubiquitin ligases, atrogin-1 and MuRF1. *Am.J.Physiol Endocrinol.Metab* 287:E591-E601.
123. Sandri, M., C. Sandri, A. Gilbert, C. Skurk, E. Calabria, A. Picard, K. Walsh, S. Schiaffino, S. H. Lecker, and A. L. Goldberg. 2004. Foxo transcription factors induce the atrophy-related ubiquitin ligase atrogin-1 and cause skeletal muscle atrophy. *Cell* 117:399-412.
124. Flueck, M. 2009. Plasticity of the muscle proteome to exercise at altitude. *High Alt.Med.Biol.* 10:183-193.
125. Combaret, L., D. Dardevet, D. Bechet, D. Taillandier, L. Mosoni, and D. Attaix. 2009. Skeletal muscle proteolysis in aging. *Curr.Opin.Clin.Nutr.Metab Care* 12:37-41.
126. Kominami, E., I. Kunio, and N. Katunuma. 1987. Activation of the intramyofibrillar autophagic-lysosomal system in muscular dystrophy. *Am.J.Pathol.* 127:461-466.
127. Tansey, W. P. 2004. Death, destruction, and the proteasome. *N.Engl.J Med.* 351:393-394.
128. Du, J., X. Wang, C. Miereles, J. L. Bailey, R. Debigare, B. Zheng, S. R. Price, and W. E. Mitch. 2004. Activation of caspase-3 is an initial step triggering accelerated muscle proteolysis in catabolic conditions. *J.Clin.Invest* 113:115-123.
129. Du, J., X. Wang, C. Miereles, J. L. Bailey, R. Debigare, B. Zheng, S. R. Price, and W. E. Mitch. 2004. Activation of caspase-3 is an initial step triggering accelerated muscle proteolysis in catabolic conditions. *J.Clin.Invest* 113:115-123.
130. Du, J., X. Wang, C. Miereles, J. L. Bailey, R. Debigare, B. Zheng, S. R. Price, and W. E. Mitch. 2004. Activation of caspase-3 is an initial step triggering accelerated muscle proteolysis in catabolic conditions. *J.Clin.Invest* 113:115-123.
131. Du, J., X. Wang, C. Miereles, J. L. Bailey, R. Debigare, B. Zheng, S. R. Price, and W. E. Mitch. 2004. Activation of caspase-3 is an initial step triggering accelerated muscle proteolysis in catabolic conditions. *J.Clin.Invest* 113:115-123.
132. Goll, D. E., V. F. Thompson, H. Li, W. Wei, and J. Cong. 2003. The calpain system. *Physiol Rev.* 83:731-801.
133. Bartoli, M. and I. Richard. 2005. Calpains in muscle wasting. *Int.J.Biochem.Cell Biol.* 37:2115-2133.
134. Spencer, M. J., D. E. Croall, and J. G. Tidball. 1995. Calpains are activated in necrotic fibers from mdx dystrophic mice. *J Biol Chem.* 270:10909-10914.
135. Doucet, M., A. P. Russell, B. Leger, R. Debigare, D. R. Joanisse, M. A. Caron, P. LeBlanc, and F. Maltais. 2007. Muscle atrophy and

- hypertrophy signaling in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 176:261-269.
136. Plant, P. J., D. Brooks, M. Faughnan, T. Bayley, J. Bain, L. Singer, J. Correa, D. Pearce, M. Binnie, and J. Batt. 2010. Cellular markers of muscle atrophy in chronic obstructive pulmonary disease. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 42:461-471.
  137. Lemire, B. B., R. Debigare, A. Dube, M. E. Theriault, C. H. Cote, and F. Maltais. 2012. MAPK Signalling in the quadriceps of patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *J Appl Physiol.*
  138. Russell, A. P. 2009. The molecular regulation of skeletal muscle mass. *Clin.Exp.Pharmacol.Physiol.*
  139. Cooper, C. B. 2009. Airflow obstruction and exercise. *Respir.Med.* 103:325-334.
  140. Pitta, F., T. Troosters, M. A. Spruit, V. S. Probst, M. Decramer, and R. Gosselink. 2005. Characteristics of physical activities in daily life in chronic obstructive pulmonary disease. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 171:972-977.
  141. Booth, F. W. 1982. Effect of limb immobilization on skeletal muscle. *J.Appl.Physiol* 52:1113-1118.
  142. Garcia-Aymerich, J., P. Lange, M. Benet, P. Schnohr, and J. M. Anto. 2006. Regular physical activity reduces hospital admission and mortality in chronic obstructive pulmonary disease: a population based cohort study. *Thorax* 61:772-778.
  143. Caron, M. A., R. Debigare, P. N. Dekhuijzen, and F. Maltais. 2009. Comparative Assessment of the Quadriceps and the Diaphragm in Patients with COPD. *J.Appl.Physiol.*
  144. Caron, A. and D. V. Neuhauser. 2001. Health care organization improvement reports using control charts for key quality characteristics: ORYX measures as examples. *Qual.Manag.Health Care* 9:28-39.
  145. Levine, S., T. Nguyen, L. R. Kaiser, N. A. Rubinstein, G. Maislin, C. Gregory, L. C. Rome, G. A. Dudley, G. C. Sieck, and J. B. Shrager. 2003. Human diaphragm remodeling associated with chronic obstructive pulmonary disease: clinical implications. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 168:706-713.
  146. Mattson, J. P. and D. C. Poole. 1998. Pulmonary emphysema decreases hamster skeletal muscle oxidative enzyme capacity. *J.Appl.Physiol* 85:210-214.
  147. Baarends, E. M., A. M. Schols, K. R. Westerterp, and E. F. Wouters. 1997. Total daily energy expenditure relative to resting energy expenditure in clinically stable patients with COPD. *Thorax* 52:780-785.
  148. Schols, A. M., E. W. Fredrix, P. B. Soeters, K. R. Westerterp, and E. F. Wouters. 1991. Resting energy expenditure in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am.J.Clin.Nutr.* 54:983-987.
  149. Sergi, G., A. Coin, S. Marin, A. Vianello, A. Manzan, S. Peruzza, E. M. Inelmen, L. Busetto, S. Mulone, and G. Enzi. 2006. Body composition

- and resting energy expenditure in elderly male patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Respir.Med.* 100:1918-1924.
150. Jounieaux, V. and I. Mayeux. 1995. Oxygen cost of breathing in patients with emphysema or chronic bronchitis in acute respiratory failure. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 152:2181-2184.
  151. Femia, R. A. and R. E. Goyette. 2005. The science of megestrol acetate delivery: potential to improve outcomes in cachexia. *BioDrugs.* 19:179-187.
  152. Decramer, M., B. F. De, P. A. Del, and S. Marinari. 2005. Systemic effects of COPD. *Respir.Med.* 99 Suppl B:S3-10.
  153. Lecker, S. H., V. Solomon, W. E. Mitch, and A. L. Goldberg. 1999. Muscle protein breakdown and the critical role of the ubiquitin-proteasome pathway in normal and disease states. *J.Nutr.* 129:227S-237S.
  154. Koehler, F., W. Doehner, S. Hoernig, C. Witt, S. D. Anker, and M. John. 2007. Anorexia in chronic obstructive pulmonary disease--association to cachexia and hormonal derangement. *Int.J.Cardiol.* 119:83-89.
  155. Koehler, F., W. Doehner, S. Hoernig, C. Witt, S. D. Anker, and M. John. 2007. Anorexia in chronic obstructive pulmonary disease--association to cachexia and hormonal derangement. *Int.J.Cardiol.* 119:83-89.
  156. Schols, A. M., P. B. Soeters, R. Mostert, R. J. Pluymers, and E. F. Wouters. 1995. Physiologic effects of nutritional support and anabolic steroids in patients with chronic obstructive pulmonary disease. A placebo-controlled randomized trial. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 152:1268-1274.
  157. Langen, R. C., A. M. Schols, M. C. Kelders, d. van, V, E. F. Wouters, and Y. M. Janssen-Heininger. 2006. Muscle wasting and impaired muscle regeneration in a murine model of chronic pulmonary inflammation. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 35:689-696.
  158. Langen, R. C., S. H. Korn, and E. F. Wouters. 2003. ROS in the local and systemic pathogenesis of COPD. *Free Radic.Biol.Med.* 35:226-235.
  159. Zhang, L., J. Du, Z. Hu, G. Han, P. Delafontaine, G. Garcia, and W. E. Mitch. 2009. IL-6 and serum amyloid A synergy mediates angiotensin II-induced muscle wasting. *J Am.Soc.Nephrol.* 20:604-612.
  160. Heinrich, P. C., I. Behrmann, S. Haan, H. M. Hermanns, G. Muller-Newen, and F. Schaper. 2003. Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem.J* 374:1-20.
  161. Heinrich, P. C., I. Behrmann, S. Haan, H. M. Hermanns, G. Muller-Newen, and F. Schaper. 2003. Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem.J* 374:1-20.
  162. Heinrich, P. C., I. Behrmann, S. Haan, H. M. Hermanns, G. Muller-Newen, and F. Schaper. 2003. Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem.J* 374:1-20.

163. Nishikawa, T., K. Hagihara, S. Serada, T. Isobe, A. Matsumura, J. Song, T. Tanaka, I. Kawase, T. Naka, and K. Yoshizaki. 2008. Transcriptional complex formation of c-Fos, Stat3, and hepatocyte NF-1 alpha is essential for cytokine-driven C-reactive protein gene expression. *J Immunol.* 180:3492-3501.
164. Song, C., K. Hsu, E. Yamen, W. Yan, J. Fock, P. K. Witting, C. L. Geczy, and S. B. Freedman. 2009. Serum amyloid A induction of cytokines in monocytes/macrophages and lymphocytes. *Atherosclerosis* 207:374-383.
165. Tiwari, P., L. P. Tripathi, T. Nishikawa-Matsumura, S. Ahmad, S. N. Song, T. Isobe, K. Mizuguchi, and K. Yoshizaki. 2013. Prediction and experimental validation of a putative non-consensus binding site for transcription factor Stat3 in serum amyloid A gene promoter. *Biochim.Biophys.Acta* 1830:3650-3655.
166. Hagihara, K., T. Nishikawa, Y. Sugamata, J. Song, T. Isobe, T. Taga, and K. Yoshizaki. 2005. Essential role of Stat3 in cytokine-driven NF-kappaB-mediated serum amyloid A gene expression. *Genes Cells* 10:1051-1063.
167. Dogra, C., H. Changotra, N. Wedhas, X. Qin, J. E. Wergedal, and A. Kumar. 2007. TNF- $\alpha$  -related weak inducer of apoptosis (TWEAK) is a potent skeletal muscle-wasting cytokine. *FASEB J.* 21:1857-1869.
168. Kandarian, S. C. and R. W. Jackman. 2006. Intracellular signaling during skeletal muscle atrophy. *Muscle Nerve* 33:155-165.
169. Debigare, R., C. H. Cote, and F. Maltais. 2001. Peripheral muscle wasting in chronic obstructive pulmonary disease. Clinical relevance and mechanisms. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 164:1712-1717.
170. Langen, R. C., A. M. Schols, M. C. Kelders, d. van, V, E. F. Wouters, and Y. M. Janssen-Heininger. 2006. Muscle wasting and impaired muscle regeneration in a murine model of chronic pulmonary inflammation. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 35:689-696.
171. Di, F. M., D. Barbier, J. L. Mege, and J. Orehek. 1994. Tumor necrosis factor-alpha levels and weight loss in chronic obstructive pulmonary disease. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 150:1453-1455.
172. Broekhuizen, R., R. F. Grimble, W. M. Howell, D. J. Shale, E. C. Creutzberg, E. F. Wouters, and A. M. Schols. 2005. Pulmonary cachexia, systemic inflammatory profile, and the interleukin 1beta -511 single nucleotide polymorphism. *Am.J.Clin.Nutr.* 82:1059-1064.
173. Alvarez, B., L. S. Quinn, S. Busquets, F. J. Lopez-Soriano, and J. M. Argiles. 2001. Direct effects of tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) on murine skeletal muscle cell lines. Bimodal effects on protein metabolism. *Eur.Cytokine Netw.* 12:399-410.
174. di Giovine, F. S., E. Takhsh, A. I. Blakemore, and G. W. Duff. 1992. Single base polymorphism at -511 in the human interleukin-1 beta gene (IL-1 beta). *Hum.Mol.Genet.* 1:450.
175. Piehl-Aulin, K., I. Jones, B. Lindvall, A. Magnuson, and S. M. bdel-Halim. 2009. Increased Serum Inflammatory Markers in the Absence of

- Clinical and Skeletal Muscle Inflammation in Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Respiration*.
176. Allen, D. L., R. R. Roy, and V. R. Edgerton. 1999. Myonuclear domains in muscle adaptation and disease. *Muscle Nerve* 22:1350-1360.
  177. Langen, R. C., A. M. Schols, M. C. Kelders, d. van, V, E. F. Wouters, and Y. M. Janssen-Heininger. 2006. Muscle wasting and impaired muscle regeneration in a murine model of chronic pulmonary inflammation. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 35:689-696.
  178. Debigare, R., K. Marquis, C. H. Cote, R. R. Tremblay, A. Michaud, P. LeBlanc, and F. Maltais. 2003. Catabolic/anabolic balance and muscle wasting in patients with COPD. *Chest* 124:83-89.
  179. Debigare, R., C. H. Cote, and F. Maltais. 2001. Peripheral muscle wasting in chronic obstructive pulmonary disease. Clinical relevance and mechanisms. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 164:1712-1717.
  180. Lamberts, S. W., A. W. van den Beld, and A. J. van der Lely. 1997. The endocrinology of aging. *Science* 278:419-424.
  181. Tissandier, O., G. Peres, J. Fiet, and F. Piette. 2001. Testosterone, dehydroepiandrosterone, insulin-like growth factor 1, and insulin in sedentary and physically trained aged men. *Eur.J.Appl.Physiol* 85:177-184.
  182. Casaburi, R. 1998. Rationale for anabolic therapy to facilitate rehabilitation in chronic obstructive pulmonary disease. *Baillieres Clin.Endocrinol.Metab* 12:407-418.
  183. Bratel, T., A. Wennlund, and K. Carlstrom. 2000. Impact of hypoxaemia on neuroendocrine function and catecholamine secretion in chronic obstructive pulmonary disease (COPD). Effects of long-term oxygen treatment. *Respir.Med.* 94:1221-1228.
  184. Barbieri, M., L. Ferrucci, E. Ragno, A. Corsi, S. Bandinelli, M. Bonafe, F. Olivieri, S. Giovagnetti, C. Franceschi, J. M. Guralnik, and G. Paolisso. 2003. Chronic inflammation and the effect of IGF-I on muscle strength and power in older persons. *Am.J.Physiol Endocrinol.Metab* 284:E481-E487.
  185. Lamberts, S. W., A. W. van den Beld, and A. J. van der Lely. 1997. The endocrinology of aging. *Science* 278:419-424.
  186. Proctor, D. N., P. Balagopal, and K. S. Nair. 1998. Age-related sarcopenia in humans is associated with reduced synthetic rates of specific muscle proteins. *J.Nutr.* 128:351S-355S.
  187. Florini, J. R., D. Z. Ewton, and S. A. Coolican. 1996. Growth hormone and the insulin-like growth factor system in myogenesis. *Endocr.Rev.* 17:481-517.
  188. Harman, S. M., E. J. Metter, J. D. Tobin, J. Pearson, and M. R. Blackman. 2001. Longitudinal effects of aging on serum total and free testosterone levels in healthy men. Baltimore Longitudinal Study of Aging. *J Clin.Endocrinol.Metab* 86:724-731.
  189. Nierman, D. M. and J. I. Mechanick. 1999. Hypotestosteronemia in chronically critically ill men. *Crit Care Med.* 27:2418-2421.



190. Van, V. M., M. A. Spruit, G. Verleden, A. Kasran, H. E. Van, F. Pitta, R. Bouillon, and M. Decramer. 2005. Hypogonadism, quadriceps weakness, and exercise intolerance in chronic obstructive pulmonary disease. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 172:1105-1111.
191. Spencer, S., P. M. Calverley, B. P. Sherwood, and P. W. Jones. 2001. Health status deterioration in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 163:122-128.
192. Debigare, R., K. Marquis, C. H. Cote, R. R. Tremblay, A. Michaud, P. LeBlanc, and F. Maltais. 2003. Catabolic/anabolic balance and muscle wasting in patients with COPD. *Chest* 124:83-89.
193. Casaburi, R., S. Bhasin, L. Cosentino, J. Porszasz, A. Somfay, M. I. Lewis, M. Fournier, and T. W. Storer. 2004. Effects of testosterone and resistance training in men with chronic obstructive pulmonary disease. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 170:870-878.
194. Sinha-Hikim, I., S. M. Roth, M. I. Lee, and S. Bhasin. 2003. Testosterone-induced muscle hypertrophy is associated with an increase in satellite cell number in healthy, young men. *Am.J.Physiol Endocrinol.Metab* 285:E197-E205.
195. Ferretti, G., H. Hauser, and P. E. di Prampero. 1990. Maximal muscular power before and after exposure to chronic hypoxia. *Int.J Sports Med.* 11 Suppl 1:S31-S34.
196. Caron, M. A., M. E. Theriault, M. E. Pare, F. Maltais, and R. Debigare. 2009. Hypoxia alters contractile protein homeostasis in L6 myotubes. *FEBS Lett.* 583:1528-1534.
197. Di, C. A., M. R. De, F. Martelli, G. Pompilio, M. C. Capogrossi, and A. Germani. 2004. Hypoxia inhibits myogenic differentiation through accelerated MyoD degradation. *J.Biol.Chem.* 279:16332-16338.
198. Orth, T. A., J. A. Allen, J. G. Wood, and N. C. Gonzalez. 2005. Exercise training prevents the inflammatory response to hypoxia in cremaster venules. *J Appl Physiol* 98:2113-2118.
199. Charge, S. B. and M. A. Rudnicki. 2004. Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiol Rev.* 84:209-238.
200. Tatsumi, R., S. M. Sheehan, H. Iwasaki, A. Hattori, and R. E. Allen. 2001. Mechanical stretch induces activation of skeletal muscle satellite cells in vitro. *Exp.Cell Res.* 267:107-114.
201. Hawke, T. J. and D. J. Garry. 2001. Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology. *J.Appl.Physiol* 91:534-551.
202. Charge, S. B. and M. A. Rudnicki. 2004. Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiol Rev.* 84:209-238.
203. Franssen, F. M., R. Broekhuizen, P. P. Janssen, E. F. Wouters, and A. M. Schols. 2005. Limb muscle dysfunction in COPD: effects of muscle wasting and exercise training. *Med.Sci.Sports Exerc.* 37:2-9.
204. Casaburi, R., S. Bhasin, L. Cosentino, J. Porszasz, A. Somfay, M. I. Lewis, M. Fournier, and T. W. Storer. 2004. Effects of testosterone and resistance training in men with chronic obstructive pulmonary disease. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 170:870-878.

205. Hawke, T. J. and D. J. Garry. 2001. Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology. *J.Appl.Physiol* 91:534-551.
206. Alan J.McComas, Brian R.MacIntosh, and Phil Gardiner. 2006. Skeletal muscle ; Form and Function, 2nd Edition ed.
207. Ennion, S., P. J. Sant'ana, A. J. Sargeant, A. Young, and G. Goldspink. 1995. Characterization of human skeletal muscle fibres according to the myosin heavy chains they express. *J Muscle Res.Cell Motil.* 16:35-43.
208. Simoneau, J. A. and C. Bouchard. 1989. Human variation in skeletal muscle fiber-type proportion and enzyme activities. *Am.J.Physiol* 257:E567-E572.
209. Mauro, A. 1961. Satellite cell of skeletal muscle fibers. *J.Cell Biol.* 9:493-495.
210. Schultz, E. and K. M. McCormick. 1994. Skeletal muscle satellite cells. *Rev.Physiol Biochem.Pharmacol.* 123:213-257.
211. Mauro, A. 1961. Satellite cell of skeletal muscle fibers. *J.Cell Biol.* 9:493-495.
212. Schmalbruch, H. and D. M. Lewis. 2000. Dynamics of nuclei of muscle fibers and connective tissue cells in normal and denervated rat muscles. *Muscle Nerve* 23:617-626.
213. Chou, S. M. and I. Nonaka. 1977. Satellite cells and muscle regeneration in diseased human skeletal muscles. *J.Neurol.Sci.* 34:131-145.
214. Schultz, E. and D. L. Jaryszak. 1985. Effects of skeletal muscle regeneration on the proliferation potential of satellite cells. *Mech.Ageing Dev.* 30:63-72.
215. Snow, M. H. 1977. The effects of aging on satellite cells in skeletal muscles of mice and rats. *Cell Tissue Res.* 185:399-408.
216. Gibson, M. C. and E. Schultz. 1982. The distribution of satellite cells and their relationship to specific fiber types in soleus and extensor digitorum longus muscles. *Anat.Rec.* 202:329-337.
217. Rosenblatt, J. D., A. I. Lunt, D. J. Parry, and T. A. Partridge. 1995. Culturing satellite cells from living single muscle fiber explants. *In Vitro Cell Dev.Biol Anim* 31:773-779.
218. Wokke, J. H., C. J. Van den Oord, G. J. Leppink, and F. G. Jennekens. 1989. Perisynaptic satellite cells in human external intercostal muscle: a quantitative and qualitative study. *Anat.Rec.* 223:174-180.
219. Schmalbruch, H. and U. Hellhammer. 1977. The number of nuclei in adult rat muscles with special reference to satellite cells. *Anat.Rec.* 189:169-175.
220. Brown, S. C. and N. C. Stickland. 1993. Satellite cell content in muscles of large and small mice. *J Anat.* 183 ( Pt 1):91-96.
221. Armand, O., A. M. Boutineau, A. Mauger, M. P. Pautou, and M. Kieny. 1983. Origin of satellite cells in avian skeletal muscles. *Arch.Anat.Microsc.Morphol.Exp.* 72:163-181.
222. Miller, J. B., L. Schaefer, and J. A. Dominov. 1999. Seeking muscle stem cells. *Curr.Top.Dev.Biol* 43:191-219.

223. Yang, X. M., K. Vogan, P. Gros, and M. Park. 1996. Expression of the met receptor tyrosine kinase in muscle progenitor cells in somites and limbs is absent in Splotch mice. *Development* 122:2163-2171.
224. Bladt, F., D. Riethmacher, S. Isenmann, A. Aguzzi, and C. Birchmeier. 1995. Essential role for the c-met receptor in the migration of myogenic precursor cells into the limb bud. *Nature* 376:768-771.
225. De, A. L., L. Berghella, M. Coletta, L. Lattanzi, M. Zanchi, M. G. Cusella-De Angelis, C. Ponzetto, and G. Cossu. 1999. Skeletal myogenic progenitors originating from embryonic dorsal aorta coexpress endothelial and myogenic markers and contribute to postnatal muscle growth and regeneration. *J. Cell Biol* 147:869-878.
226. Gros, J., M. Manceau, V. Thome, and C. Marcelle. 2005. A common somitic origin for embryonic muscle progenitors and satellite cells. *Nature* 435:954-958.
227. Jackson, K. A., T. Mi, and M. A. Goodell. 1999. Hematopoietic potential of stem cells isolated from murine skeletal muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 96:14482-14486.
228. Seale, P., A. Asakura, and M. A. Rudnicki. 2001. The potential of muscle stem cells. *Dev. Cell* 1:333-342.
229. Lagasse, E., H. Connors, M. Al-Dhalimy, M. Reitsma, M. Dohse, L. Osborne, X. Wang, M. Finegold, I. L. Weissman, and M. Grompe. 2000. Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nat Med.* 6:1229-1234.
230. Jackson, K. A., S. M. Majka, H. Wang, J. Pocius, C. J. Hartley, M. W. Majesky, M. L. Entman, L. H. Michael, K. K. Hirschi, and M. A. Goodell. 2001. Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells. *J Clin. Invest* 107:1395-1402.
231. Jackson, K. A., S. M. Majka, H. Wang, J. Pocius, C. J. Hartley, M. W. Majesky, M. L. Entman, L. H. Michael, K. K. Hirschi, and M. A. Goodell. 2001. Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells. *J Clin. Invest* 107:1395-1402.
232. Krause, D. S., N. D. Theise, M. I. Collector, O. Henegariu, S. Hwang, R. Gardner, S. Neutzel, and S. J. Sharkis. 2001. Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell* 105:369-377.
233. Gussoni, E., Y. Soneoka, C. D. Strickland, E. A. Buzney, M. K. Khan, A. F. Flint, L. M. Kunkel, and R. C. Mulligan. 1999. Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation. *Nature* 401:390-394.
234. Sorichter, S., J. Mair, A. Koller, E. Muller, C. Kremser, W. Judmaier, C. Haid, C. Calzolari, and B. Puschendorf. 2001. Creatine kinase, myosin heavy chains and magnetic resonance imaging after eccentric exercise. *J Sports Sci.* 19:687-691.
235. Alderton, J. M. and R. A. Steinhardt. 2000. Calcium influx through calcium leak channels is responsible for the elevated levels of calcium-dependent proteolysis in dystrophic myotubes. *J Biol Chem.* 275:9452-9460.

236. Kwak, K. B., S. S. Chung, O. M. Kim, M. S. Kang, D. B. Ha, and C. H. Chung. 1993. Increase in the level of m-calpain correlates with the elevated cleavage of filamin during myogenic differentiation of embryonic muscle cells. *Biochim.Biophys.Acta* 1175:243-249.
237. Tidball, J. G. 2005. Inflammatory processes in muscle injury and repair. *Am.J.Physiol Regul.Integr.Comp Physiol* 288:R345-R353.
238. Rappolee, D. A. and Z. Werb. 1992. Macrophage-derived growth factors. *Curr.Top.Microbiol.Immunol.* 181:87-140.
239. Robertson, T. A., M. A. Maley, M. D. Grounds, and J. M. Papadimitriou. 1993. The role of macrophages in skeletal muscle regeneration with particular reference to chemotaxis. *Exp.Cell Res* 207:321-331.
240. Fielding, R. A., T. J. Manfredi, W. Ding, M. A. Fiatarone, W. J. Evans, and J. G. Cannon. 1993. Acute phase response in exercise. III. Neutrophil and IL-1 beta accumulation in skeletal muscle. *Am.J Physiol* 265:R166-R172.
241. Tidball, J. G. 1995. Inflammatory cell response to acute muscle injury. *Med.Sci.Sports Exerc.* 27:1022-1032.
242. Tidball, J. G. 1995. Inflammatory cell response to acute muscle injury. *Med.Sci.Sports Exerc.* 27:1022-1032.
243. Merly, F., L. Lescaudron, T. Rouaud, F. Crossin, and M. F. Gardahaut. 1999. Macrophages enhance muscle satellite cell proliferation and delay their differentiation. *Muscle Nerve* 22:724-732.
244. Weller, B., G. Karpati, S. Lehnert, and S. Carpenter. 1991. Major alteration of the pathological phenotype in gamma irradiated mdx soleus muscles. *J.Neuropathol.Exp.Neurol.* 50:419-431.
245. Quinlan, J. G., S. P. Lyden, D. M. Cambier, S. R. Johnson, S. E. Michaels, and D. L. Denman. 1995. Radiation inhibition of mdx mouse muscle regeneration: dose and age factors. *Muscle Nerve* 18:201-206.
246. Darr, K. C. and E. Schultz. 1987. Exercise-induced satellite cell activation in growing and mature skeletal muscle. *J.Appl.Physiol* 63:1816-1821.
247. Snow, M. H. 1978. An autoradiographic study of satellite cell differentiation into regenerating myotubes following transplantation of muscles in young rats. *Cell Tissue Res.* 186:535-540.
248. Snow, M. H. 1983. A quantitative ultrastructural analysis of satellite cells in denervated fast and slow muscles of the mouse. *Anat.Rec.* 207:593-604.
249. Hall-Craggs, E. C. and H. S. Seyan. 1975. Histochemical changes in innervated and denervated skeletal muscle fibers following treatment with bupivacaine (marcain). *Exp.Neurol.* 46:345-354.
250. Whalen, R. G., J. B. Harris, G. S. Butler-Browne, and S. Sesodia. 1990. Expression of myosin isoforms during notexin-induced regeneration of rat soleus muscles. *Dev.Biol.* 141:24-40.
251. Whalen, R. G., J. B. Harris, G. S. Butler-Browne, and S. Sesodia. 1990. Expression of myosin isoforms during notexin-induced regeneration of rat soleus muscles. *Dev.Biol.* 141:24-40.

252. Charge, S. B. and M. A. Rudnicki. 2004. Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiol Rev.* 84:209-238.
253. Suzuki, J., Y. Yamazaki, G. Li, Y. Kaziro, and H. Koide. 2000. Involvement of Ras and Ral in chemotactic migration of skeletal myoblasts. *Mol.Cell Biol.* 20:4658-4665.
254. Schultz, E., D. L. Jaryszak, and C. R. Valliere. 1985. Response of satellite cells to focal skeletal muscle injury. *Muscle Nerve* 8:217-222.
255. Tatsumi, R., J. E. Anderson, C. J. Nevoret, O. Halevy, and R. E. Allen. 1998. HGF/SF is present in normal adult skeletal muscle and is capable of activating satellite cells. *Dev.Biol* 194:114-128.
256. Allen, R. E., S. M. Sheehan, R. G. Taylor, T. L. Kendall, and G. M. Rice. 1995. Hepatocyte growth factor activates quiescent skeletal muscle satellite cells in vitro. *J.Cell Physiol* 165:307-312.
257. Miller, K. J., D. Thaloor, S. Matteson, and G. K. Pavlath. 2000. Hepatocyte growth factor affects satellite cell activation and differentiation in regenerating skeletal muscle. *Am.J.Physiol Cell Physiol* 278:C174-C181.
258. Merly, F., L. Lescaudron, T. Rouaud, F. Crossin, and M. F. Gardahaut. 1999. Macrophages enhance muscle satellite cell proliferation and delay their differentiation. *Muscle Nerve* 22:724-732.
259. Suzuki, S., K. Yamanouchi, C. Soeta, Y. Katakai, R. Harada, K. Naito, and H. Tojo. 2002. Skeletal muscle injury induces hepatocyte growth factor expression in spleen. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 292:709-714.
260. Suzuki, J., Y. Yamazaki, G. Li, Y. Kaziro, and H. Koide. 2000. Involvement of Ras and Ral in chemotactic migration of skeletal myoblasts. *Mol.Cell Biol.* 20:4658-4665.
261. Bischoff, R. 1997. Chemotaxis of skeletal muscle satellite cells. *Dev.Dyn.* 208:505-515.
262. Miller, K. J., D. Thaloor, S. Matteson, and G. K. Pavlath. 2000. Hepatocyte growth factor affects satellite cell activation and differentiation in regenerating skeletal muscle. *Am.J.Physiol Cell Physiol* 278:C174-C181.
263. Allen, R. E. and L. K. Boxhorn. 1989. Regulation of skeletal muscle satellite cell proliferation and differentiation by transforming growth factor-beta, insulin-like growth factor I, and fibroblast growth factor. *J.Cell Physiol* 138:311-315.
264. LeRoith, D., M. McGuinness, J. Shemer, B. Stannard, F. Lanau, T. N. Faria, H. Kato, H. Werner, M. Adamo, and C. T. Roberts, Jr. 1992. Insulin-like growth factors. *Biol.Signals* 1:173-181.
265. Vierck, J., B. O'Reilly, K. Hossner, J. Antonio, K. Byrne, L. Bucci, and M. Dodson. 2000. Satellite cell regulation following myotrauma caused by resistance exercise. *Cell Biol.Int.* 24:263-272.
266. Allen, R. E. and L. K. Boxhorn. 1989. Regulation of skeletal muscle satellite cell proliferation and differentiation by transforming growth factor-beta, insulin-like growth factor I, and fibroblast growth factor. *J.Cell Physiol* 138:311-315.

267. Engert, J. C., E. B. Berglund, and N. Rosenthal. 1996. Proliferation precedes differentiation in IGF-I-stimulated myogenesis. *J.Cell Biol.* 135:431-440.
268. Coleman, M. E., F. DeMayo, K. C. Yin, H. M. Lee, R. Geske, C. Montgomery, and R. J. Schwartz. 1995. Myogenic vector expression of insulin-like growth factor I stimulates muscle cell differentiation and myofiber hypertrophy in transgenic mice. *J.Biol.Chem.* 270:12109-12116.
269. Chakravarthy, M. V., B. S. Davis, and F. W. Booth. 2000. IGF-I restores satellite cell proliferative potential in immobilized old skeletal muscle. *J.Appl.Physiol* 89:1365-1379.
270. Chakravarthy, M. V., B. S. Davis, and F. W. Booth. 2000. IGF-I restores satellite cell proliferative potential in immobilized old skeletal muscle. *J.Appl.Physiol* 89:1365-1379.
271. Lawlor, M. A. and P. Rotwein. 2000. Insulin-like growth factor-mediated muscle cell survival: central roles for Akt and cyclin-dependent kinase inhibitor p21. *Mol.Cell Biol.* 20:8983-8995.
272. Chakravarthy, M. V., T. W. Abraha, R. J. Schwartz, M. L. Fiorotto, and F. W. Booth. 2000. Insulin-like growth factor-I extends in vitro replicative life span of skeletal muscle satellite cells by enhancing G1/S cell cycle progression via the activation of phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signaling pathway. *J.Biol.Chem.* 275:35942-35952.
273. Coolican, S. A., D. S. Samuel, D. Z. Ewton, F. J. McWade, and J. R. Florini. 1997. The mitogenic and myogenic actions of insulin-like growth factors utilize distinct signaling pathways. *J.Biol.Chem.* 272:6653-6662.
274. Semsarian, C., M. J. Wu, Y. K. Ju, T. Marciniak, T. Yeoh, D. G. Allen, R. P. Harvey, and R. M. Graham. 1999. Skeletal muscle hypertrophy is mediated by a Ca<sup>2+</sup>-dependent calcineurin signalling pathway. *Nature* 400:576-581.
275. Allen, R. E. and L. K. Boxhorn. 1989. Regulation of skeletal muscle satellite cell proliferation and differentiation by transforming growth factor-beta, insulin-like growth factor I, and fibroblast growth factor. *J.Cell Physiol* 138:311-315.
276. Greene, E. A. and R. E. Allen. 1991. Growth factor regulation of bovine satellite cell growth in vitro. *J.Anim Sci.* 69:146-152.
277. Kastner, S., M. C. Elias, A. J. Rivera, and Z. Yablonka-Reuveni. 2000. Gene expression patterns of the fibroblast growth factors and their receptors during myogenesis of rat satellite cells. *J.Histochem.Cytochem.* 48:1079-1096.
278. Sheehan, S. M. and R. E. Allen. 1999. Skeletal muscle satellite cell proliferation in response to members of the fibroblast growth factor family and hepatocyte growth factor. *J.Cell Physiol* 181:499-506.
279. Clegg, C. H., T. A. Linkhart, B. B. Olwin, and S. D. Hauschka. 1987. Growth factor control of skeletal muscle differentiation: commitment to terminal differentiation occurs in G1 phase and is repressed by fibroblast growth factor. *J.Cell Biol.* 105:949-956.

280. Spizz, G., J. S. Hu, and E. N. Olson. 1987. Inhibition of myogenic differentiation by fibroblast growth factor or type beta transforming growth factor does not require persistent c-myc expression. *Dev.Biol.* 123:500-507.
281. Floss, T., H. H. Arnold, and T. Braun. 1997. A role for FGF-6 in skeletal muscle regeneration. *Genes Dev.* 11:2040-2051.
282. Jones, N. C., Y. V. Fedorov, R. S. Rosenthal, and B. B. Olwin. 2001. ERK1/2 is required for myoblast proliferation but is dispensable for muscle gene expression and cell fusion. *J.Cell Physiol* 186:104-115.
283. Whitman, M. 1998. Smads and early developmental signaling by the TGFbeta superfamily. *Genes Dev.* 12:2445-2462.
284. Whitman, M. 1998. Smads and early developmental signaling by the TGFbeta superfamily. *Genes Dev.* 12:2445-2462.
285. Allen, R. E. and L. K. Boxhorn. 1989. Regulation of skeletal muscle satellite cell proliferation and differentiation by transforming growth factor-beta, insulin-like growth factor I, and fibroblast growth factor. *J.Cell Physiol* 138:311-315.
286. Kocamis, H., D. C. McFarland, and J. Killefer. 2001. Temporal expression of growth factor genes during myogenesis of satellite cells derived from the biceps femoris and pectoralis major muscles of the chicken. *J.Cell Physiol* 186:146-152.
287. Zentella, A. and J. Massague. 1992. Transforming growth factor beta induces myoblast differentiation in the presence of mitogens. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 89:5176-5180.
288. Martin, J. F., L. Li, and E. N. Olson. 1992. Repression of myogenin function by TGF-beta 1 is targeted at the basic helix-loop-helix motif and is independent of E2A products. *J.Biol.Chem.* 267:10956-10960.
289. Yamanouchi, K., C. Soeta, K. Naito, and H. Tojo. 2000. Expression of myostatin gene in regenerating skeletal muscle of the rat and its localization. *Biochem.Biophys.Res Commun.* 270:510-516.
290. McPherron, A. C., A. M. Lawler, and S. J. Lee. 1997. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member. *Nature* 387:83-90.
291. McPherron, A. C., A. M. Lawler, and S. J. Lee. 1997. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member. *Nature* 387:83-90.
292. Carlson, C. J., F. W. Booth, and S. E. Gordon. 1999. Skeletal muscle myostatin mRNA expression is fiber-type specific and increases during hindlimb unloading. *Am.J.Physiol* 277:R601-R606.
293. Hibi, M., K. Nakajima, and T. Hirano. 1996. IL-6 cytokine family and signal transduction: a model of the cytokine system. *J.Mol.Med.* 74:1-12.
294. Hawke, T. J. and D. J. Garry. 2001. Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology. *J.Appl.Physiol* 91:534-551.
295. Anderson, J. E. 2000. A role for nitric oxide in muscle repair: nitric oxide-mediated activation of muscle satellite cells. *Mol.Biol.Cell* 11:1859-1874.

296. Husmann, I., L. Soulet, J. Gautron, I. Martelly, and D. Barritault. 1996. Growth factors in skeletal muscle regeneration. *Cytokine Growth Factor Rev.* 7:249-258.
297. Hawke, T. J. and D. J. Garry. 2001. Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology. *J.Appl.Physiol* 91:534-551.
298. Joubert, Y. and C. Tobin. 1995. Testosterone treatment results in quiescent satellite cells being activated and recruited into cell cycle in rat levator ani muscle. *Dev.Biol.* 169:286-294.
299. Buckingham, M. E. 1994. Muscle: the regulation of myogenesis. *Curr.Opin.Genet.Dev.* 4:745-751.
300. Buckingham, M. E. 1994. Muscle: the regulation of myogenesis. *Curr.Opin.Genet.Dev.* 4:745-751.
301. Vasyutina, E., D. C. Lenhard, and C. Birchmeier. 2007. Notch function in myogenesis. *Cell Cycle* 6:1451-1454.
302. Buas, M. F., S. Kabak, and T. Kadesch. 2009. Inhibition of myogenesis by Notch: evidence for multiple pathways. *J.Cell Physiol* 218:84-93.
303. Le, G. F. and M. Rudnicki. 2007. Satellite and stem cells in muscle growth and repair. *Development* 134:3953-3957.
304. Conboy, I. M. and T. A. Rando. 2002. The regulation of Notch signaling controls satellite cell activation and cell fate determination in postnatal myogenesis. *Dev.Cell* 3:397-409.
305. Seale, P., A. Poleskaya, and M. A. Rudnicki. 2003. Adult stem cell specification by Wnt signaling in muscle regeneration. *Cell Cycle* 2:418-419.
306. Brack, A. S., I. M. Conboy, M. J. Conboy, J. Shen, and T. A. Rando. 2008. A temporal switch from notch to Wnt signaling in muscle stem cells is necessary for normal adult myogenesis. *Cell Stem Cell* 2:50-59.
307. Mansouri, A., G. Goudreau, and P. Gruss. 1999. Pax genes and their role in organogenesis. *Cancer Res* 59:1707s-1709s.
308. Seale, P., L. A. Sabourin, A. Girgis-Gabardo, A. Mansouri, P. Gruss, and M. A. Rudnicki. 2000. Pax7 is required for the specification of myogenic satellite cells. *Cell* 102:777-786.
309. Goulding, M. D., G. Chalepakis, U. Deutsch, J. R. Erselius, and P. Gruss. 1991. Pax-3, a novel murine DNA binding protein expressed during early neurogenesis. *EMBO J.* 10:1135-1147.
310. Kuang, S., S. B. Charge, P. Seale, M. Huh, and M. A. Rudnicki. 2006. Distinct roles for Pax7 and Pax3 in adult regenerative myogenesis. *J.Cell Biol.* 172:103-113.
311. Seale, P., L. A. Sabourin, A. Girgis-Gabardo, A. Mansouri, P. Gruss, and M. A. Rudnicki. 2000. Pax7 is required for the specification of myogenic satellite cells. *Cell* 102:777-786.
312. Seale, P., L. A. Sabourin, A. Girgis-Gabardo, A. Mansouri, P. Gruss, and M. A. Rudnicki. 2000. Pax7 is required for the specification of myogenic satellite cells. *Cell* 102:777-786.



313. Seale, P., L. A. Sabourin, A. Girgis-Gabardo, A. Mansouri, P. Gruss, and M. A. Rudnicki. 2000. Pax7 is required for the specification of myogenic satellite cells. *Cell* 102:777-786.
314. Cooper, R. N., S. Tajbakhsh, V. Mouly, G. Cossu, M. Buckingham, and G. S. Butler-Browne. 1999. In vivo satellite cell activation via Myf5 and MyoD in regenerating mouse skeletal muscle. *J.Cell Sci.* 112 ( Pt 17):2895-2901.
315. Cornelison, D. D. and B. J. Wold. 1997. Single-cell analysis of regulatory gene expression in quiescent and activated mouse skeletal muscle satellite cells. *Dev.Biol.* 191:270-283.
316. Smith, C. K., M. J. Janney, and R. E. Allen. 1994. Temporal expression of myogenic regulatory genes during activation, proliferation, and differentiation of rat skeletal muscle satellite cells. *J.Cell Physiol* 159:379-385.
317. Yablonka-Reuveni, Z. and A. J. Rivera. 1994. Temporal expression of regulatory and structural muscle proteins during myogenesis of satellite cells on isolated adult rat fibers. *Dev.Biol.* 164:588-603.
318. Cooper, R. N., S. Tajbakhsh, V. Mouly, G. Cossu, M. Buckingham, and G. S. Butler-Browne. 1999. In vivo satellite cell activation via Myf5 and MyoD in regenerating mouse skeletal muscle. *J.Cell Sci.* 112 ( Pt 17):2895-2901.
319. Cornelison, D. D. and B. J. Wold. 1997. Single-cell analysis of regulatory gene expression in quiescent and activated mouse skeletal muscle satellite cells. *Dev.Biol.* 191:270-283.
320. Megeney, L. A., B. Kablar, K. Garrett, J. E. Anderson, and M. A. Rudnicki. 1996. MyoD is required for myogenic stem cell function in adult skeletal muscle. *Genes Dev.* 10:1173-1183.
321. Kaul, A., M. Koster, H. Neuhaus, and T. Braun. 2000. Myf5 revisited: loss of early myotome formation does not lead to a rib phenotype in homozygous Myf5 mutant mice. *Cell* 102:17-19.
322. Kablar, B. and M. A. Rudnicki. 2000. Skeletal muscle development in the mouse embryo. *Histol.Histopathol.* 15:649-656.
323. Schultz, E. 1996. Satellite cell proliferative compartments in growing skeletal muscles. *Dev.Biol.* 175:84-94.
324. Conboy, I. M. and T. A. Rando. 2002. The regulation of Notch signaling controls satellite cell activation and cell fate determination in postnatal myogenesis. *Dev.Cell* 3:397-409.
325. Baroffio, A., M. Hamann, L. Bernheim, M. L. Bochaton-Piallat, G. Gabbiani, and C. R. Bader. 1996. Identification of self-renewing myoblasts in the progeny of single human muscle satellite cells. *Differentiation* 60:47-57.
326. Yoshida, N., S. Yoshida, K. Koishi, K. Masuda, and Y. Nabeshima. 1998. Cell heterogeneity upon myogenic differentiation: down-regulation of MyoD and Myf5 generates 'reserve cells'. *J.Cell Sci.* 111 ( Pt 6):769-779.
327. Smith, C. K., M. J. Janney, and R. E. Allen. 1994. Temporal expression of myogenic regulatory genes during activation, proliferation, and

- differentiation of rat skeletal muscle satellite cells. *J.Cell Physiol* 159:379-385.
328. Cornelison, D. D. and B. J. Wold. 1997. Single-cell analysis of regulatory gene expression in quiescent and activated mouse skeletal muscle satellite cells. *Dev.Biol.* 191:270-283.
329. Smith, C. K., M. J. Janney, and R. E. Allen. 1994. Temporal expression of myogenic regulatory genes during activation, proliferation, and differentiation of rat skeletal muscle satellite cells. *J.Cell Physiol* 159:379-385.
330. Yablonka-Reuveni, Z. and A. J. Rivera. 1994. Temporal expression of regulatory and structural muscle proteins during myogenesis of satellite cells on isolated adult rat fibers. *Dev.Biol.* 164:588-603.
331. Zhou, Z. and A. Bornemann. 2001. MRF4 protein expression in regenerating rat muscle. *J.Muscle Res.Cell Motil.* 22:311-316.
332. Zeschnigk, M., D. Kozian, C. Kuch, M. Schmoll, and A. Starzinski-Powitz. 1995. Involvement of M-cadherin in terminal differentiation of skeletal muscle cells. *J.Cell Sci.* 108 ( Pt 9):2973-2981.
333. Irintchev, A., M. Zeschnigk, A. Starzinski-Powitz, and A. Wernig. 1994. Expression pattern of M-cadherin in normal, denervated, and regenerating mouse muscles. *Dev.Dyn.* 199:326-337.
334. Barani, A. E., A. C. Durieux, O. Sabido, and D. Freyssenet. 2003. Age-related changes in the mitotic and metabolic characteristics of muscle-derived cells. *J.Appl.Physiol* 95:2089-2098.
335. Sajko, S., L. Kubinova, E. Cvetko, M. Kreft, A. Wernig, and I. Erzen. 2004. Frequency of M-cadherin-stained satellite cells declines in human muscles during aging. *J.Histochem.Cytochem.* 52:179-185.
336. Carlson, B. M., E. I. Dedkov, A. B. Borisov, and J. A. Faulkner. 2001. Skeletal muscle regeneration in very old rats. *J.Gerontol.A Biol.Sci.Med.Sci.* 56:B224-B233.
337. Carlson, B. M., E. I. Dedkov, A. B. Borisov, and J. A. Faulkner. 2001. Skeletal muscle regeneration in very old rats. *J.Gerontol.A Biol.Sci.Med.Sci.* 56:B224-B233.
338. Shefer, G., D. P. Van de Mark, J. B. Richardson, and Z. Yablonka-Reuveni. 2006. Satellite-cell pool size does matter: defining the myogenic potency of aging skeletal muscle. *Dev.Biol.* 294:50-66.
339. Degens, H. 2007. Age-related skeletal muscle dysfunction: causes and mechanisms. *J.Musculoskelet.Neuronal.Interact.* 7:246-252.
340. Amack, J. D. and M. S. Mahadevan. 2004. Myogenic defects in myotonic dystrophy. *Dev.Biol.* 265:294-301.
341. Oexle, K. and A. Kohlschutter. 2001. Cause of progression in Duchenne muscular dystrophy: impaired differentiation more probable than replicative aging. *Neuropediatrics* 32:123-129.
342. Langen, R. C., A. M. Schols, M. C. Kelders, d. van, V, E. F. Wouters, and Y. M. Janssen-Heininger. 2006. Muscle wasting and impaired muscle regeneration in a murine model of chronic pulmonary inflammation. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 35:689-696.

343. Langen, R. C., d. Van, V, A. M. Schols, M. C. Kelders, E. F. Wouters, and Y. M. Janssen-Heininger. 2004. Tumor necrosis factor-alpha inhibits myogenic differentiation through MyoD protein destabilization. *FASEB J.* 18:227-237.
344. Conboy, I. M., M. J. Conboy, A. J. Wagers, E. R. Girma, I. L. Weissman, and T. A. Rando. 2005. Rejuvenation of aged progenitor cells by exposure to a young systemic environment. *Nature* 433:760-764.
345. Conboy, I. M., M. J. Conboy, A. J. Wagers, E. R. Girma, I. L. Weissman, and T. A. Rando. 2005. Rejuvenation of aged progenitor cells by exposure to a young systemic environment. *Nature* 433:760-764.
346. Langen, R. C., A. M. Schols, M. C. Kelders, E. F. Wouters, and Y. M. Janssen-Heininger. 2001. Inflammatory cytokines inhibit myogenic differentiation through activation of nuclear factor-kappaB. *FASEB J.* 15:1169-1180.
347. Mackey, A. L., M. Kjaer, S. Dandanell, K. H. Mikkelsen, L. Holm, S. Dossing, F. Kadi, S. O. Koskinen, C. H. Jensen, H. D. Schroder, and H. Langberg. 2007. The influence of anti-inflammatory medication on exercise-induced myogenic precursor cell responses in humans. *J.Appl.Physiol* 103:425-431.
348. Langen, R. C., A. M. Schols, M. C. Kelders, E. F. Wouters, and Y. M. Janssen-Heininger. 2001. Inflammatory cytokines inhibit myogenic differentiation through activation of nuclear factor-kappaB. *FASEB J.* 15:1169-1180.
349. Guttridge, D. C., M. W. Mayo, L. V. Madrid, C. Y. Wang, and A. S. Baldwin, Jr. 2000. NF-kappa B-Induced Loss of MyoD Messenger RNA: Possible Role in Muscle Decay and Cachexia. *Science* 289:2363-2366.
350. Conboy, I. M., M. J. Conboy, G. M. Smythe, and T. A. Rando. 2003. Notch-mediated restoration of regenerative potential to aged muscle. *Science* 302:1575-1577.
351. Morrison, S. J., A. M. Wandycz, K. Akashi, A. Globerson, and I. L. Weissman. 1996. The aging of hematopoietic stem cells. *Nat Med.* 2:1011-1016.
352. Conboy, I. M. and T. A. Rando. 2002. The regulation of Notch signaling controls satellite cell activation and cell fate determination in postnatal myogenesis. *Dev.Cell* 3:397-409.
353. Conboy, I. M. and T. A. Rando. 2005. Aging, stem cells and tissue regeneration: lessons from muscle. *Cell Cycle* 4:407-410.
354. Carey, K. A., M. M. Farnfield, S. D. Tarquinio, and D. Cameron-Smith. 2007. Impaired expression of Notch signaling genes in aged human skeletal muscle. *J.Gerontol.A Biol.Sci.Med.Sci.* 62:9-17.
355. Carey, K. A., M. M. Farnfield, S. D. Tarquinio, and D. Cameron-Smith. 2007. Impaired expression of Notch signaling genes in aged human skeletal muscle. *J.Gerontol.A Biol.Sci.Med.Sci.* 62:9-17.

356. Conboy, I. M., M. J. Conboy, G. M. Smythe, and T. A. Rando. 2003. Notch-mediated restoration of regenerative potential to aged muscle. *Science* 302:1575-1577.
357. Conboy, I. M., M. J. Conboy, G. M. Smythe, and T. A. Rando. 2003. Notch-mediated restoration of regenerative potential to aged muscle. *Science* 302:1575-1577.
358. Shefer, G., D. P. Van de Mark, J. B. Richardson, and Z. Yablonka-Reuveni. 2006. Satellite-cell pool size does matter: defining the myogenic potency of aging skeletal muscle. *Dev.Biol.* 294:50-66.
359. Jejurikar, S. S., C. L. Marcelo, and W. M. Kuzon, Jr. 2002. Skeletal muscle denervation increases satellite cell susceptibility to apoptosis. *Plast.Reconstr.Surg.* 110:160-168.
360. Jejurikar, S. S., E. A. Henkelman, P. S. Cederna, C. L. Marcelo, M. G. Urbanek, and W. M. Kuzon, Jr. 2006. Aging increases the susceptibility of skeletal muscle derived satellite cells to apoptosis. *Exp.Gerontol.* 41:828-836.
361. Krajnak, K., S. Waugh, R. Miller, B. Baker, K. Geronilla, S. E. Alway, and R. G. Cutlip. 2006. Proapoptotic factor Bax is increased in satellite cells in the tibialis anterior muscles of old rats. *Muscle Nerve* 34:720-730.
362. Jejurikar, S. S., E. A. Henkelman, P. S. Cederna, C. L. Marcelo, M. G. Urbanek, and W. M. Kuzon, Jr. 2006. Aging increases the susceptibility of skeletal muscle derived satellite cells to apoptosis. *Exp.Gerontol.* 41:828-836.
363. Tidball, J. G., D. E. Albrecht, B. E. Lokensgard, and M. J. Spencer. 1995. Apoptosis precedes necrosis of dystrophin-deficient muscle. *J.Cell Sci.* 108 ( Pt 6):2197-2204.
364. Allen, D. L., R. R. Roy, and V. R. Edgerton. 1999. Myonuclear domains in muscle adaptation and disease. *Muscle Nerve* 22:1350-1360.
365. Darr, K. C. and E. Schultz. 1989. Hindlimb suspension suppresses muscle growth and satellite cell proliferation. *J.Appl.Physiol* 67:1827-1834.
366. Alway, S. E. and P. M. Siu. 2008. Nuclear apoptosis contributes to sarcopenia. *Exerc.Sport Sci.Rev.* 36:51-57.
367. Jejurikar, S. S., E. A. Henkelman, P. S. Cederna, C. L. Marcelo, M. G. Urbanek, and W. M. Kuzon, Jr. 2006. Aging increases the susceptibility of skeletal muscle derived satellite cells to apoptosis. *Exp.Gerontol.* 41:828-836.
368. Agusti, A. G., J. Sauleda, C. Miralles, C. Gomez, B. Togores, E. Sala, S. Batle, and X. Busquets. 2002. Skeletal muscle apoptosis and weight loss in chronic obstructive pulmonary disease. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 166:485-489.
369. Bekaert, S., H. Derradji, and S. Baatout. 2004. Telomere biology in mammalian germ cells and during development. *Dev.Biol.* 274:15-30.
370. Decary, S., V. Mouly, C. B. Hamida, A. Sautet, J. P. Barbet, and G. S. Butler-Browne. 1997. Replicative potential and telomere length in

- human skeletal muscle: implications for satellite cell-mediated gene therapy. *Hum.Gene Ther.* 8:1429-1438.
371. Lund, T. C., R. W. Grange, and D. A. Lowe. 2007. Telomere shortening in diaphragm and tibialis anterior muscles of aged mdx mice. *Muscle Nerve* 36:387-390.
  372. Campisi, J. 2001. From cells to organisms: can we learn about aging from cells in culture? *Exp.Gerontol.* 36:607-618.
  373. Lund, T. C., R. W. Grange, and D. A. Lowe. 2007. Telomere shortening in diaphragm and tibialis anterior muscles of aged mdx mice. *Muscle Nerve* 36:387-390.
  374. Collins, M., V. Renault, L. A. Grobler, G. A. St Clair, M. I. Lambert, D. E. Wayne, G. S. Butler-Browne, T. D. Noakes, and V. Mouly. 2003. Athletes with exercise-associated fatigue have abnormally short muscle DNA telomeres. *Med.Sci.Sports Exerc.* 35:1524-1528.
  375. Collins, M., V. Renault, L. A. Grobler, G. A. St Clair, M. I. Lambert, D. E. Wayne, G. S. Butler-Browne, T. D. Noakes, and V. Mouly. 2003. Athletes with exercise-associated fatigue have abnormally short muscle DNA telomeres. *Med.Sci.Sports Exerc.* 35:1524-1528.
  376. Lund, T. C., R. W. Grange, and D. A. Lowe. 2007. Telomere shortening in diaphragm and tibialis anterior muscles of aged mdx mice. *Muscle Nerve* 36:387-390.
  377. Degens, H. 2007. Age-related skeletal muscle dysfunction: causes and mechanisms. *J.Musculoskelet.Neuronal.Interact.* 7:246-252.
  378. Amack, J. D. and M. S. Mahadevan. 2004. Myogenic defects in myotonic dystrophy. *Dev.Biol.* 265:294-301.
  379. Oexle, K. and A. Kohlschutter. 2001. Cause of progression in Duchenne muscular dystrophy: impaired differentiation more probable than replicative aging. *Neuropediatrics* 32:123-129.
  380. Charge, S. B. and M. A. Rudnicki. 2004. Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiol Rev.* 84:209-238.
  381. Degens, H. 2007. Age-related skeletal muscle dysfunction: causes and mechanisms. *J.Musculoskelet.Neuronal.Interact.* 7:246-252.
  382. Amack, J. D. and M. S. Mahadevan. 2004. Myogenic defects in myotonic dystrophy. *Dev.Biol.* 265:294-301.
  383. Oexle, K. and A. Kohlschutter. 2001. Cause of progression in Duchenne muscular dystrophy: impaired differentiation more probable than replicative aging. *Neuropediatrics* 32:123-129.
  384. Morley, J. E., D. R. Thomas, and M. M. Wilson. 2006. Cachexia: pathophysiology and clinical relevance. *American Journal of Clinical Nutrition* 83:735-743.
  385. Franssen, F. M., R. Broekhuizen, P. P. Janssen, E. F. Wouters, and A. M. Schols. 2004. Effects of whole-body exercise training on body composition and functional capacity in normal-weight patients with COPD. *Chest* 125:2021-2028.
  386. Schuelke, M., K. R. Wagner, L. E. Stolz, C. Hubner, T. Riebel, W. Komen, T. Braun, J. F. Tobin, and S. J. Lee. 2004. Myostatin mutation

- associated with gross muscle hypertrophy in a child. *N.Engl.J Med.* 350:2682-2688.
387. Reardon, K. A., J. Davis, R. M. Kapsa, P. Choong, and E. Byrne. 2001. Myostatin, insulin-like growth factor-1, and leukemia inhibitory factor mRNAs are upregulated in chronic human disuse muscle atrophy. *Muscle Nerve* 24:893-899.
  388. Ryall, J. G., J. E. Church, and G. S. Lynch. 2009. A novel role for beta-adrenoceptor signalling in skeletal muscle growth, development and regeneration. *Clin Exp.Pharmacol.Physiol.*
  389. Hinkle, R. T., K. M. Hodge, D. B. Cody, R. J. Sheldon, B. K. Kobilka, and R. J. Isfort. 2002. Skeletal muscle hypertrophy and anti-atrophy effects of clenbuterol are mediated by the beta2-adrenergic receptor. *Muscle Nerve* 25:729-734.
  390. Johnson, M. and S. Rennard. 2001. Alternative Mechanisms for Long-Acting  $\beta_2$ -Adrenergic Agonists in COPD\*. *Chest* 120:258-270.
  391. Calverley, P., R. Pauwels, J. r. Vestbo, P. Jones, N. Pride, A. Gulsvik, J. Anderson, and C. Maden. 2003. Combined salmeterol and fluticasone in the treatment of chronic obstructive pulmonary disease: a randomised controlled trial. *The Lancet* 361:449-456.
  392. Stockley, R. A., N. Chopra, and L. Rice. 2006. Addition of salmeterol to existing treatment in patients with COPD: a 12 month study. *Thorax* 61:122-128.
  393. Lynch, G. S. and J. G. Ryall. 2008. Role of beta-adrenoceptor signaling in skeletal muscle: implications for muscle wasting and disease. *Physiol Rev.* 88:729-767.
  394. Langen, R. C., A. M. Schols, M. C. Kelders, E. F. Wouters, and Y. M. Janssen-Heininger. 2001. Inflammatory cytokines inhibit myogenic differentiation through activation of nuclear factor-kappaB. *FASEB J.* 15:1169-1180.
  395. Barnes, P. J. 2009. The cytokine network in chronic obstructive pulmonary disease. *Am.J Respir.Cell Mol.Biol* 41:631-638.
  396. van Helvoort, H. A., Y. F. Heijdra, H. M. Thijs, J. Vina, G. J. Wanten, and P. N. Dekhuijzen. 2006. Exercise-induced systemic effects in muscle-wasted patients with COPD. *Med.Sci.Sports Exerc.* 38:1543-1552.
  397. Schols, A. M., W. A. Buurman, Staal van den Brekel AJ, M. A. Dentener, and E. F. Wouters. 1996. Evidence for a relation between metabolic derangements and increased levels of inflammatory mediators in a subgroup of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax* 51:819-824.
  398. Vernooij, J. H., M. Kucukaycan, J. A. Jacobs, N. H. Chavannes, W. A. Buurman, M. A. Dentener, and E. F. Wouters. 2002. Local and systemic inflammation in patients with chronic obstructive pulmonary disease: soluble tumor necrosis factor receptors are increased in sputum. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 166:1218-1224.

399. Di, F. M., D. Barbier, J. L. Mege, and J. Orehek. 1994. Tumor necrosis factor-alpha levels and weight loss in chronic obstructive pulmonary disease. *Am.J Respir.Crit Care Med.* 150:1453-1455.
400. Rabinovich, R. A., M. Figueras, E. Ardite, N. Carbo, T. Troosters, X. Filella, J. A. Barbera, J. C. Fernandez-Checa, J. M. Argiles, and J. Roca. 2003. Increased tumour necrosis factor-alpha plasma levels during moderate-intensity exercise in COPD patients. *Eur.Respir.J.* 21:789-794.
401. Seemungal, T., R. Harper-Owen, A. Bhowmik, I. Moric, G. Sanderson, S. Message, P. Maccallum, T. W. Meade, D. J. Jeffries, S. L. Johnston, and J. A. Wedzicha. 2001. Respiratory viruses, symptoms, and inflammatory markers in acute exacerbations and stable chronic obstructive pulmonary disease. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 164:1618-1623.
402. Zakyntinos, E. and N. Pappa. 2009. Inflammatory biomarkers in coronary artery disease. *J Cardiol.* 53:317-333.
403. Malle, E., S. Sodin-Semrl, and A. Kovacevic. 2009. Serum amyloid A: an acute-phase protein involved in tumour pathogenesis. *Cell Mol.Life Sci.* 66:9-26.
404. Perlman, H., K. Bradley, H. Liu, S. Cole, E. Shamiyeh, R. C. Smith, K. Walsh, S. Fiore, A. E. Koch, G. S. Firestein, G. K. Haines, III, and R. M. Pope. 2003. IL-6 and matrix metalloproteinase-1 are regulated by the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 in synovial fibroblasts. *J.Immunol.* 170:838-845.
405. Langen, R. C., A. M. Schols, M. C. Kelders, E. F. Wouters, and Y. M. Janssen-Heininger. 2001. Inflammatory cytokines inhibit myogenic differentiation through activation of nuclear factor-kappaB. *FASEB J.* 15:1169-1180.
406. Decary, S., C. B. Hamida, V. Mouly, J. P. Barbet, F. Hentati, and G. S. Butler-Browne. 2000. Shorter telomeres in dystrophic muscle consistent with extensive regeneration in young children. *Neuromuscul.Disord.* 10:113-120.
407. Kadi, F., E. Ponsot, K. Piehl-Aulin, A. Mackey, M. Kjaer, E. Oskarsson, and L. Holm. 2008. The effects of regular strength training on telomere length in human skeletal muscle. *Med.Sci.Sports Exerc.* 40:82-87.
408. Greider, C. W. 1996. Telomere length regulation. *Annu.Rev.Biochem.* 65:337-365.
409. O'Connor, M. S., M. E. Carlson, and I. M. Conboy. 2009. Differentiation rather than aging of muscle stem cells abolishes their telomerase activity. *Biotechnol.Prog.*
410. Cattani, V., N. Mercier, J. P. Gardner, V. Regnault, C. Labat, J. Maki-Jouppila, R. Nzietchueng, A. Benetos, M. Kimura, A. Aviv, and P. Lacolley. 2008. Chronic oxidative stress induces a tissue-specific reduction in telomere length in CAST/Ei mice. *Free Radic.Biol Med.* 44:1592-1598.

411. Theriault, M. E., M. E. Pare, F. Maltais, and R. Debigare. 2012. Satellite Cells Senescence in Limb Muscle of Severe Patients with COPD. *PLoS.ONE*. 7:e39124.
412. Sajko, S., L. Kubinova, E. Cvetko, M. Kreft, A. Wernig, and I. Erzen. 2004. Frequency of M-cadherin-stained satellite cells declines in human muscles during aging. *J.Histochem.Cytochem.* 52:179-185.
413. Faulkner, J. A., S. V. Brooks, and E. Zerba. 1995. Muscle atrophy and weakness with aging: contraction-induced injury as an underlying mechanism. *J.Gerontol.A Biol.Sci.Med.Sci.* 50 Spec No:124-129.
414. Alnaqeeb, M. A. and G. Goldspink. 1987. Changes in fibre type, number and diameter in developing and ageing skeletal muscle. *J.Anat.* 153:31-45.
415. Shadrach, J. L. and A. J. Wagers. 2011. Stem cells for skeletal muscle repair. *Philos.Trans.R.Soc.Lond B Biol.Sci.* 366:2297-2306.
416. Carlson, B. M., E. I. Dedkov, A. B. Borisov, and J. A. Faulkner. 2001. Skeletal muscle regeneration in very old rats. *J.Gerontol.A Biol.Sci.Med.Sci.* 56:B224-B233.
417. Carlson, B. M. and J. A. Faulkner. 1989. Muscle transplantation between young and old rats: age of host determines recovery. *Am.J.Physiol* 256:C1262-C1266.
418. Teramoto, S., Y. Fukuchi, Y. Uejima, K. Teramoto, and H. Orimo. 1993. Influences of chronic tobacco smoke inhalation on aging and oxidant-antioxidant balance in the senescence-accelerated mouse (SAM)-P/2. *Exp.Gerontol.* 28:87-95.
419. Holz, O., I. Zuhlke, E. Jaksztat, K. C. Muller, L. Welker, M. Nakashima, K. D. Diemel, D. Branscheid, H. Magnussen, and R. A. Jorres. 2004. Lung fibroblasts from patients with emphysema show a reduced proliferation rate in culture. *Eur.Respir.J.* 24:575-579.
420. Tsuji, T., K. Aoshiba, and A. Nagai. 2006. Alveolar cell senescence in patients with pulmonary emphysema. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 174:886-893.
421. Legerlotz, K. and H. K. Smith. 2008. Role of MyoD in denervated, disused, and exercised muscle. *Muscle Nerve* 38:1087-1100.
422. Bonetto, A., T. Aydogdu, N. Kunzevitzky, D. C. Guttridge, S. Khuri, L. G. Koniaris, and T. A. Zimmers. 2011. Stat3 activation in skeletal muscle links muscle wasting and the acute phase response in cancer cachexia. *PLoS.ONE*. 6:e22538.
423. Urieli-Shoval, S., R. P. Linke, and Y. Matzner. 2000. Expression and function of serum amyloid A, a major acute-phase protein, in normal and disease states. *Curr.Opin.Hematol.* 7:64-69.
424. Yip, T. T., J. W. Chan, W. C. Cho, T. T. Yip, Z. Wang, T. L. Kwan, S. C. Law, D. N. Tsang, J. K. Chan, K. C. Lee, W. W. Cheng, V. W. Ma, C. Yip, C. K. Lim, R. K. Ngan, J. S. Au, A. Chan, and W. W. Lim. 2005. Protein chip array profiling analysis in patients with severe acute respiratory syndrome identified serum amyloid a protein as a biomarker potentially useful in monitoring the extent of pneumonia. *Clin.Chem.* 51:47-55.



425. Coqueret, O. and H. Gascan. 2000. Functional interaction of Stat3 transcription factor with the cell cycle inhibitor p21WAF1/CIP1/SDI1. *J.Biol.Chem.* 275:18794-18800.
426. Langen, R. C., A. M. Schols, M. C. Kelders, E. F. Wouters, and Y. M. Janssen-Heininger. 2001. Inflammatory cytokines inhibit myogenic differentiation through activation of nuclear factor-kappaB. *FASEB J.* 15:1169-1180.
427. Heinrich, P. C., I. Behrmann, S. Haan, H. M. Hermanns, G. Muller-Newen, and F. Schaper. 2003. Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem.J* 374:1-20.
428. Heinrich, P. C., I. Behrmann, S. Haan, H. M. Hermanns, G. Muller-Newen, and F. Schaper. 2003. Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem.J* 374:1-20.
429. Nishikawa, T., K. Hagihara, S. Serada, T. Isobe, A. Matsumura, J. Song, T. Tanaka, I. Kawase, T. Naka, and K. Yoshizaki. 2008. Transcriptional complex formation of c-Fos, Stat3, and hepatocyte NF-1 alpha is essential for cytokine-driven C-reactive protein gene expression. *J Immunol.* 180:3492-3501.
430. Song, C., K. Hsu, E. Yamen, W. Yan, J. Fock, P. K. Witting, C. L. Geczy, and S. B. Freedman. 2009. Serum amyloid A induction of cytokines in monocytes/macrophages and lymphocytes. *Atherosclerosis* 207:374-383.
431. Tiwari, P., L. P. Tripathi, T. Nishikawa-Matsumura, S. Ahmad, S. N. Song, T. Isobe, K. Mizuguchi, and K. Yoshizaki. 2013. Prediction and experimental validation of a putative non-consensus binding site for transcription factor Stat3 in serum amyloid A gene promoter. *Biochim.Biophys.Acta* 1830:3650-3655.
432. Hagihara, K., T. Nishikawa, Y. Sugamata, J. Song, T. Isobe, T. Taga, and K. Yoshizaki. 2005. Essential role of Stat3 in cytokine-driven NF-kappaB-mediated serum amyloid A gene expression. *Genes Cells* 10:1051-1063.
433. Skuk, D. and J. P. Tremblay. 2003. Myoblast transplantation: the current status of a potential therapeutic tool for myopathies. *J.Muscle Res.Cell Motil.* 24:285-300.
434. Fan, Y., M. Maley, M. Beilharz, and M. Grounds. 1996. Rapid death of injected myoblasts in myoblast transfer therapy. *Muscle Nerve* 19:853-860.
435. Han, H. Q., X. Zhou, W. E. Mitch, and A. L. Goldberg. 2013. Myostatin/activin pathway antagonism: Molecular basis and therapeutic potential. *Int.J.Biochem.Cell Biol.* 45:2333-2347.