

Marie-Eve Thériault

**CARACTÉRISATION DES CELLULES
SATELLITES CHEZ DES PERSONNES AYANT
UNE MALADIE PULMONAIRE OBSTRUCTIVE
CHRONIQUE**

Mémoire présenté
à la Faculté des études supérieures de l'Université Laval
dans le cadre du programme de maîtrise en Médecine expérimentale
pour l'obtention du grade de maître ès sciences (M.Sc.)

Faculté de médecine
Université Laval
Québec

2010

Résumé

CARACTÉRISATION DES CELLULES SATELLITES MUSCULAIRES PROVENANT DE PATIENTS AYANT UNE MALADIE PULMONAIRE OBSTRUCTIVE CHRONIQUE

La maladie pulmonaire obstructive chronique (MPOC) est caractérisée par une obstruction bronchique irréversible et progressive. L'atrophie musculaire périphérique est fréquente dans la MPOC et a un impact négatif sur la qualité de vie, la capacité fonctionnelle et la survie des sujets atteints. Un déficit dans la régénération du tissu musculaire pourrait contribuer au développement de l'atrophie musculaire, mais n'a jamais été directement évalué chez les sujets ayant une MPOC. La maintenance et la réparation du tissu musculaire sont du ressort des cellules satellites. Un nombre insuffisant de cellules satellites combinés ou non à un processus déficient de multiplication et de différenciation pourrait altérer la capacité du tissu musculaire à récupérer adéquatement à la suite d'un exercice physique ou d'un dommage musculaire. Nous proposons l'hypothèse que le potentiel de régénération musculaire est déficient chez les patients ayant une MPOC comparativement à des sujets sains d'âge similaire, contribuant ainsi au développement de l'atrophie musculaire observée chez ceux-ci. Pour vérifier cette hypothèse, un modèle de culture cellulaire primaire obtenu à partir d'échantillons musculaires a dû être développé. Ce projet permettra pour la première fois de mettre en culture et de caractériser les cellules satellites musculaires provenant de biopsies de patients ayant une MPOC, et d'évaluer leur potentiel de régénération. De plus, ce modèle pourra être utilisé pour répondre à différentes questions associées à la signalisation musculaire propre à la MPOC.

Remerciements

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

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 ce projet de maîtrise qui maintenant me passionne. Richard est un directeur passionné par la recherche et pour qui l'enseignement est très important, rendant cette expérience enrichissante.

Merci également au Dr. François Maltais pour m'avoir initié à la recherche clinique et son désir d'améliorer le sort de ces patients.

Je tiens également à remercier Annie Michaud, Marie-Ève Paré, Marc-André Caron, Annie Dubé ou quiconque ayant déjà répondu à mes interrogations lors de ma formation. Merci de m'avoir appris les techniques que je maîtrise maintenant ou 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 cru en moi, pour avoir toujours appuyé mes choix et pour avoir toujours supporté la direction que j'ai choisie. Merci!

Sans oublier amis, amies, connaissances et autres personnes responsables du support moral nécessaire lors d'études gradués. J'en retiens que de bons moments.

Table des matières

RÉSUMÉ	II
REMERCIEMENTS	III
TABLE DES MATIÈRES	IV
Liste des tableaux	VIII
Liste des abréviations	IX
CHAPITRE 1	1
1.1 LA MALADIE PULMONAIRE OBSTRUCTIVE CHRONIQUE	2
1.1.1 Généralités	2
1.1.2 Épidémiologie	3
1.1.3 Étiologie	5
1.1.3.1 Facteurs intrinsèques	5
1.1.3.2 Facteurs extrinsèques	8
1.1.4 Physiopathologie	9
1.1.4.1 Inflammation	11
1.1.4.2 Déséquilibre protéases/antiprotéases	12
1.1.4.3 Stress oxydatif	13
1.1.5 Traitements	14
1.1.6 Effets systémiques associés à la MPOC	16
1.2 L'ATROPHIE MUSCULAIRE PÉRIPHÉRIQUE DANS LA MPOC	20
1.2.1 Voie de signalisation impliquée dans la synthèse et la dégradation des protéines musculaires	21
1.2.1.1 Synthèse protéique	21
1.2.1.2 Dégradation protéique	22
1.2.2 L'inactivité chronique	24
1.2.3 Déficit énergétique	24
1.2.4 Stress oxydatif/inflammation	25
1.2.5 Déficit hormonal	27
1.2.6 L'hypoxémie	27
1.2.7 Régénération musculaire	28
1.3 LES CELLULES SATELLITES	30
1.3.1 Le muscle squelettique	30
1.3.2 Généralités	30
1.3.3 Formation des cellules satellites	32
1.3.4 Activation	34
1.3.4.1 Signaux d'activation	35
1.3.4.2 Myogenèse	38
1.3.5 Causes possibles de l'implication des cellules satellites dans l'atrophie musculaire.	41
1.3.5.1 Altération des capacités intrinsèques des cellules satellites	42
1.3.5.2 Environnement des cellules satellites	44

1.3.5.3 <i>Accélération du déclin des fonctions des cellules satellites</i>	45
1.3.5.4 <i>Augmentation de l'apoptose cellulaire</i>	46
1.3.5.5 <i>Sénescence répllicative des cellules satellites</i>	47
1.4 OBJECTIFS ET HYPOTHÈSES DE RECHERCHE	49
1.4.1 <i>Objectifs et hypothèses de recherche</i>	49
1.5 MÉTHODOLOGIES	51
1.5.1 <i>Modèle et méthodologies utilisés</i>	51
	52
CHAPITRE 2	53
2.1 ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF PERIPHERAL MUSCLE SATELLITE CELLS FROM PATIENTS WITH CHRONIC OBSTRUCTIVE PULMONARY DISEASE.	54
2.1.1 <i>Résumé</i>	54
2.1.2 <i>Title page</i>	56
2.1.3 <i>Abstract</i>	57
2.1.4 <i>Abbreviations</i>	59
2.1.5 <i>Introduction</i>	60
2.1.6 <i>Materials and Methods</i>	62
2.1.7 <i>Results</i>	65
2.1.8 <i>Discussion</i>	67
2.1.9 <i>Grants</i>	71
2.1.10 <i>References</i>	72
2.1.11 <i>Figures Legends</i>	77
2.1.12 <i>Figures</i>	78
CHAPITRE 3	85
3.1 SOMMAIRE DES RÉSULTATS	86
3.2 PERTINENCE DES RÉSULTATS	87
3.2 PERSPECTIVES	88
RÉFÉRENCES	90

Liste des figures

Chapitre 1

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

4

Figure 1.2 Hospitalisations dues à une MPOC au Canada de 1950 à 2010 réparties par sexe.

4

Figure 1.3 Décès dus à une MPOC au Canada de 1950 à 2010 répartis par sexe.

7

Figure 1.4 Courbe de survie de quatre sous-groupes de MPOC séparées selon leurs fonctions respiratoires et de leurs surfaces de cuisses.

18

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

20

Figure 1.6 Options se présentant aux cellules satellites suite à leur activation.

29

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

31

Figure 1.8 Multiples signaux d'activation des cellules satellites.

35

Chapitre 2

Figure 2.1 Primary muscles cells cultures obtain from a needle biopsy of the *vastus lateralis* from a COPD patient.

80

Figure 2.2 Satellite cells immunohistochemistry against the Paired box transcription factor 7 (Pax-7) to assess culture purity.

81

Figure 2.3 Western blot against Pax7 and neural cell adhesion molecule (NCAM) on total protein extract of cells isolated.

82

Figure 2.4 Proliferation potential of cells cultured from COPD patients and control subject

83

Figure 2.5.A. Representative Western blot on total protein extract isolated from control subject (figure 5.1) and from patients with COPD (figure 5.2).

84

Figure 2.5.B. Quantification of the Myosin Heavy Chain protein on total protein extract isolated from control subject and from patients with COPD.

84

Liste des tableaux

Chapitre 1

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

10

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

15

Tableau 3 Principales comorbidités associées à la MPOC.

16

Chapitre 2

Table 1 Subject characteristics

78

Table 2 Cell number after each passage

79

Liste des abréviations

AAT	Alpha-1 Antitrypsine
ADN	Adénosine Désoxyribonucléique
ATS	American Thoracic Society
BAD	Bcl-Associated Death promoter
c-met	Mesenchymal-Epithelial Transition factor
COPD	Chronic Obstructive Pulmonary Disease
CRP	Protéines C Réactives
CVD	Cardiovascular Disease
CVF	Capacité Vitale Forcée
DHEA	Déshydroépiandrostérone
DHEAS	Déshydroépiandrostérone Sulfate
DLco	Capacité de Diffusion du Monoxyde de Carbone
FEV1	Force expiratory volume in one second
FGF	Fibroblast Growth Factor
FoxO	Forkhead box of the class O
FSH	Follicle Stimulating Hormone
GSK-3β	Glycogen Synthase Kinase-3 β
GOLD	Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease
HGF	Hepatocyte Growth Factor
HIF-1α	Hypoxia-Inducible-Factor-1 α
IL	Interleukine
LH	Luteinizing Hormone
MAP	Mitogen Activated Protein
MTCSA	Midhigh cross-sectional area.
MMP	Métalloprotéases
MPOC	Maladie Pulmonaire Obstructive Chronique
MRF	Myogenic Regulatory Factors
mTOR	mammalian Target of Rapamycin
Myf-5	Myogenic Factor 5

MyoD	Myogenic differentiation 1
NCAM	Neural Cell Adhesion Molecule
NFAT	Nuclear factor of activated T-cells
Nf-κB	Nuclear Factor-κB
NRF2	Nuclear Factor Erythroid-related Factor 2
Pax	Paired Box transcription factors
PI3K	Phosphatidylinositol-3-kinases
ROS	Reactive oxygen species
SIDA	Syndrome d'immunodéficience acquise
SNP	Single Nucleotide Polymorphisms
TGF	Transforming Growth factors
TNF	Tumor Necrosis Factor
TNFR	Tumor Necrosis Factor Receptor
TUNEL	Terminal deoxynucleodityl Transferase-mediated dUTP-biotin Nick End Labelling
UPP	Ubiquitin Proteasome Pathway.
VEMS	Volume Expiratoire Forcé en une Seconde

Chapitre 1

INTRODUCTION

Chapitre un - Introduction

1.1 La Maladie Pulmonaire Obstructive Chronique

1.1.1 Généralités

La Maladie Pulmonaire Obstructive Chronique (MPOC) est une atteinte pulmonaire évitable qui est 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 en réaction à des particules ou des gaz nocifs. La MPOC est un acronyme regroupant deux maladies distinctes soient : l'emphysème et la bronchite chronique.⁴

L'obstruction bronchique 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 suite à plusieurs années de tabagisme. Chez les patients ayant une MPOC, la contribution de la bronchite chronique ou de l'emphysème causant une MPOC diffère selon chaque individu.⁵

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.⁴ Une inflammation chronique occasionne des changements structuraux et un rétrécissement bronchique avec une production accrue de sécrétion. La destruction du parenchyme pulmonaire engendrée par l'inflammation chronique mène à une destruction des alvéoles entraînant une diminution du recul élastique pulmonaire et occasionnant l'affaissement des voies respiratoires lors de l'expiration.⁴

L'emphysème quant à elle 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 et le deuxième type est l'emphysème panlobulaire qui affecte les bronchioles terminales, les canaux et les sacs alvéolaires avec 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. ⁴

Outre l'atteinte pulmonaire qui définit cette maladie, il est clairement démontré que d'autres tissus, distants du système pulmonaire, ont une fonction qui se détériore à mesure que la MPOC progresse en sévérité. Parmi ceux-ci, le système musculaire intéresse particulièrement la communauté scientifique compte tenu de son impact significatif sur la qualité de vie et la survie des patients atteints. ⁶ Les processus régulant la régénération musculaire méritent une attention approfondie à cause de la possible implication des cellules satellites dans le processus conduisant à l'atrophie musculaire.

1.1.2 Épidémiologie

La prévalence de la MPOC est de 3.9% chez les hommes et de 4.8% chez les femmes avec une augmentation en fonction de l'âge. Dernièrement, une augmentation de la prévalence de la maladie chez les adultes dans la tranche de 45-49 ans a été dénotée. Une importante augmentation de la prévalence chez les femmes est également préoccupante. ⁷ La MPOC se classe au 4^e rang des causes de décès chez les Canadiens en affectant près de 1 500 000 personnes au pays. Cependant, il s'agit d'une maladie largement sous-diagnostiquée ⁸ puisqu'on estime que 1 600 000 Canadiens de plus seraient possiblement symptomatiques. ⁹ On prévoit également que la MPOC grimpera au 3^e rang mondial des causes de décès d'ici 2020 ^{10,11} 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. ¹²

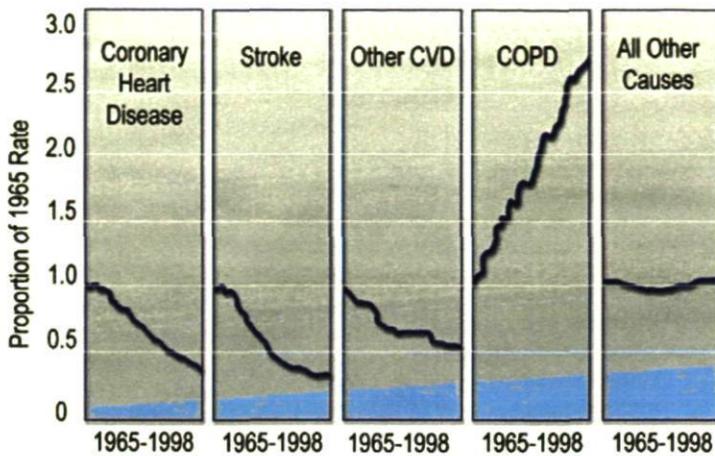
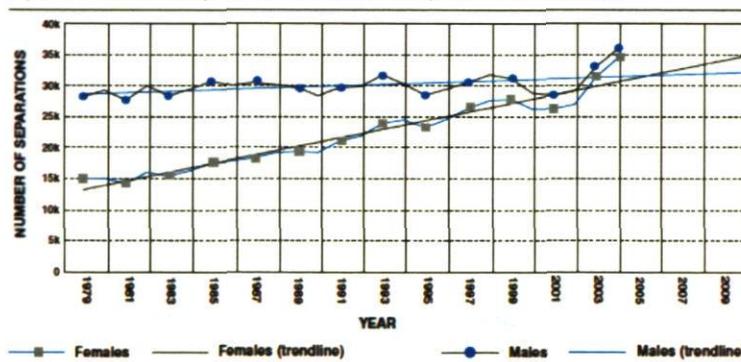


Figure 1.1 Différence en pourcentage du taux de mortalité de 1965 en comparaison avec le taux de mortalité de 1998 des principales causes de décès aux États-Unis. ⁶ Abbreviations: CVD, Cardiovascular disease; COPD, Chronic Obstructive Pulmonary Disease.

La figure 1.1 démontre l'importance de la progression du taux de mortalité relié à une MPOC avec une augmentation de près de 163 % du nombre de décès en 1998 par rapport au taux de l'année 1965 aux États-Unis. Et ce, contrairement à toutes les autres maladies dont le taux de mortalité ne cesse de diminuer en importance durant cette même période. Notamment, 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.

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 dus à une MPOC au Canada de 1950 à 2010 répartis par sexe. ²

années. Au Canada, les coûts directs ont été estimés à 1,67 milliards \$ CDN et a

L'impact financier de la MPOC est non négligeable. En plus de l'ampleur que cette maladie prend en termes de décès, elle représente des coûts faramineux d'hospitalisations comme le démontre la figure 1.2 et l'on prévoit une augmentation des coûts dans les prochaines

plus du double pour les coûts indirects selon un rapport de Santé Canada publié en 2002. ¹³ L'augmentation de la prévalence de la maladie s'accompagne d'une augmentation des coûts liés au nombre d'hospitalisations et des décès.

1.1.3 Étiologie

La séquence d'événement conduisant au développement d'une MPOC est toujours mal connue. Il n'est resté pas moins que la cause primaire du développement d'une MPOC une histoire tabagique. Le lent développement de la maladie explique également l'augmentation actuelle de la prévalence qui coïncide avec les années de fortes consommations tabagiques de la révolution industrielle. 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. ¹⁴ De plus, l'hétérogénéité que peut prendre la maladie chez deux sujets ayant eu une exposition similaire à la cigarette suggère que d'autres causes, comme une prédisposition génétique, sont importantes dans le développement de la maladie. ¹⁵ Les facteurs conduisant au développement 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 susceptibles de contribuer à l'initiation de la maladie auxquels un individu fera face au cours de sa vie.

1.1.3.1 Facteurs intrinsèques

Les facteurs génétiques constituent le principal facteur intrinsèque susceptible de contribuer au développement de la MPOC et le déficit en alpha-1 antitrypsine (AAT) en est un bon exemple. Environ 1 à 2 % des personnes atteintes d'une MPOC en serait affectées. Cette maladie demeure difficile à diagnostiquer puisqu'un test génétique est nécessaire, donc on peut supposer une sous-estimation du taux réel. ¹⁶ Environ 75 à 80 % des personnes ayant une carence en AAT 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 diminution 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.¹⁷ Chez les sujets ayant une carence en AAT, le ratio de protéases/antiprotéases n'est pas respecté conduisant à la dégradation lente et continue de la matrice pulmonaire.¹⁸

D'autres gènes ont été proposés pour tenter d'expliquer en partie le développement d'une MPOC, tels que ceux de la vitamine D,¹⁹ le groupe sanguin ABO,²⁰ le « Tumor Necrosis Factor » (TNF), diverses « glutathione S-transferases »²¹ et la « Heme oxygenase 1 ». ²² Cependant, les évidences démontrant un lien 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 les « single nucleotide polymorphisms » (SNPs) que l'on retrouve entre chaque individu pourraient plausiblement constituer une partie de l'énigme. Des études ont associé des polymorphismes sur le gène du TNF²³ et sur le gène de type IV du collagène $\alpha 3$ ²⁴ avec une augmentation de la susceptibilité de développer la maladie. 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.

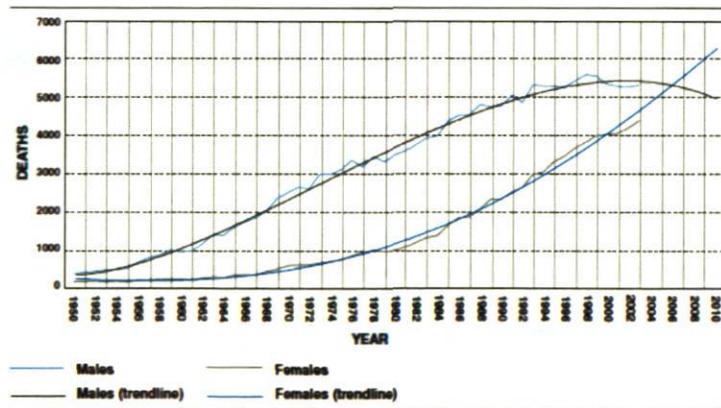
Autre facteur généralement reconnu comme agent contribuant à la réponse inflammatoire exagérée dans la MPOC, est la capacité à contrer les effets du stress oxydatif. La fumée de cigarette est une source riche en oxydants et des évidences s'accumulent sur l'augmentation du stress oxydatif chez les fumeurs.²⁵ L'équilibre oxydant/antioxydant doit être maintenu pour qu'un tissu puisse assurer sa survie et sa fonction. 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 de « Nuclear factor erythroid-related factor 2 » (NRF2).²⁶ Récemment, il a été démontré chez des patients ayant une MPOC, une diminution de la protéine NRF2 et de la protéine DJ-1, laquelle stabilise NRF2 et qui favorise l'induction des antioxydants en réponse à la fumée de cigarette.²⁶ Ceci suggère que les malades pulmonaires ont une diminution du niveau des antioxydants sous le contrôle de NRF2 ce qui réduit leur capacité à contrer le stress oxydatif.

Finalement, la littérature a récemment démontré que le genre de l'individu pouvait jouer un rôle dans le développement de la MPOC.²⁷ Premièrement, les femmes seraient davantage susceptibles à avoir une hyperréactivité bronchique, un phénomène pouvant conduire au développement de la MPOC.²⁸ Deuxièmement, malgré des résultats discordants, il apparaît que les femmes, par leur physiologie et leur génétique propre, sont davantage prédisposées à développer une MPOC que les hommes.²⁹ La figure 1.3 illustre l'augmentation constante projetée du nombre de décès chez les femmes dues à cette maladie. L'augmentation des décès liés 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 niveau de sévérité de maladie, la sévérité des symptômes (dyspnée, toux et expectoration) serait plus prononcée chez la femme que chez l'homme.^{30;31 32}

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, 2005 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.²

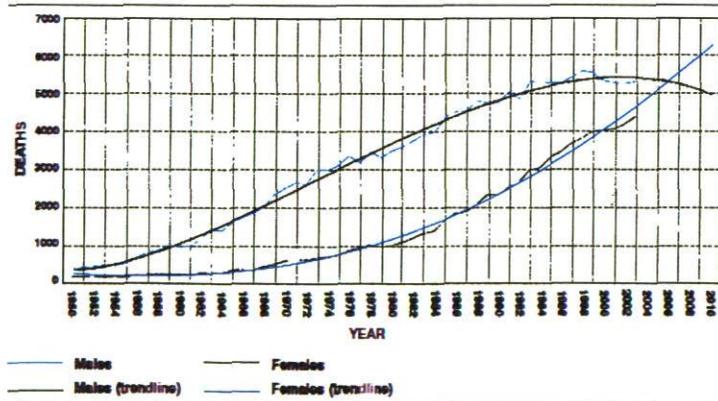
Les facteurs génétiques, tels qu'un déficit en AAT, seraient responsables de la susceptibilité de développer une MPOC sans assurément causer la maladie.

l'expression est dépendante de « Nuclear factor erythroid-related factor 2 » (NRF2).²⁶ Récemment, il a été démontré chez des patients ayant une MPOC, une diminution de la protéine NRF2 et de la protéine DJ-1, laquelle stabilise NRF2 et qui favorise l'induction des antioxydants en réponse à la fumée de cigarette.²⁶ Ceci suggère que les malades pulmonaires ont une diminution du niveau des antioxydants sous le contrôle de NRF2 ce qui réduit leur capacité à contrer le stress oxydatif.

Finalement, la littérature a récemment démontré que le genre de l'individu pouvait jouer un rôle dans le développement de la MPOC.²⁷ Premièrement, les femmes seraient davantage susceptibles à avoir une hyperréactivité bronchique, un phénomène pouvant conduire au développement de la MPOC.²⁸ Deuxièmement, malgré des résultats discordants, il apparaît que les femmes, par leur physiologie et leur génétique propre, sont davantage prédisposées à développer une MPOC que les hommes.²⁹ La figure 1.3 illustre l'augmentation constante projetée du nombre de décès chez les femmes dues à cette maladie. L'augmentation des décès liés 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 niveau de sévérité de maladie, la sévérité des symptômes (dyspnée, toux et expectoration) serait plus prononcée chez la femme que chez l'homme.^{30;31 32}

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



* deaths from 2005 to 2010 are projected
 CD10 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.²

Les facteurs génétiques, tels qu'un déficit en AAT, seraient responsables de la susceptibilité de développer une MPOC sans assurément causer la maladie.

Cependant, une combinaison de facteurs intrinsèques et de facteurs extrinsèques pourrait expliquer l'hétérogénéité de la maladie que l'on retrouve inter-individu.

1.1.3.2 Facteurs extrinsèques

Les facteurs extrinsèques se rapportent aux environnements auxquels un sujet fera face au cours de sa vie et pouvant potentiellement conduire à l'initiation de la MPOC. De manière générale, ces environnements ont en commun l'inhalation de substances nocives, de poussières et de polluants causant une inflammation pulmonaire.

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 étant responsable de 90 % des cas diagnostiqués. Près de la moitié des fumeurs auront une obstruction des voies respiratoires et 10 à 20 % des fumeurs développeront une MPOC cliniquement significative.³³ Une corrélation existe entre le risque de développer la maladie avec l'âge de début du tabagisme, le nombre de paquets fumés par année et l'exposition actuelle au tabagisme ou à la fumée secondaire.¹¹

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^{34;35} ou lors d'une exposition soutenue à des polluants atmosphériques.³⁶ De fait, une augmentation de la prévalence du diagnostic ou de symptômes de la MPOC a été reliée avec des zones polluées.³⁷ 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 toujours le charbon comme mode de combustion.

Certains environnements de travail peuvent potentiellement amorcer la séquence d'événements conduisant à une MPOC. Selon l'ATS, l'exposition au

milieu de travail explique 15 % des cas qui seront diagnostiqués avec une maladie respiratoire incluant la MPOC et l'asthme.³⁸ Parmi les environnements contribuant au développement de la maladie, on retrouve les porcheries, les scieries et les mines.³⁹ Ces lieux ont tous en commun des niveaux élevés de poussières en suspension et polluants pénétrant facilement les voies respiratoires.

Plusieurs facteurs intrinsèques et extrinsèques peuvent conduire au développement d'une MPOC. La combinaison d'un ou de plusieurs de ces facteurs sont responsable de la susceptibilité et de la sévérité d'un sujet dans son environnement 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.⁴ Ces nombreux changements sont responsables de la toux, de l'abondance des expectorations et de la dyspnée, les trois principales plaintes 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. ⁴⁰ Le volume expiratoire maximal en 1 seconde (VEMS) est une mesure du débit aérien maximal calculée durant une seconde obtenue durant 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. ¹¹

Classification des stades de sévérité de la MPOC	
Stade	Caractéristiques
0 : Personne à risque	<ul style="list-style-type: none"> • Spirométrie normale • Symptômes chroniques (toux, production d'expectoration)
I : MPOC légère	<ul style="list-style-type: none"> • VEMS/CVF < 70% • VEMS ≥ 80% de la prédite • Avec ou sans symptômes
II : MPOC modérée	<p>IIA</p> <ul style="list-style-type: none"> • VEMS/CVF < 70% • 50% ≤ VEMS < 80% de la prédite • Avec ou sans symptômes <p>IIB</p> <ul style="list-style-type: none"> • VEMS/CVF < 70% • 30% ≤ VEMS < 50% de la prédite • Avec ou sans symptômes
III : MPOC sévère	<ul style="list-style-type: none"> • VEMS/CVF < 70% • VEMS < 30% de la prédite <p>ou</p> <ul style="list-style-type: none"> • VEMS < 50% de la prédite avec insuffisance respiratoire ou insuffisance cardiaque droite

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 pathogénèse 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. ⁴¹ Le chevauchement potentiel entre ces processus et le nombre de

facteurs de risques susceptibles d'initier ou moduler ceux-ci compliquent la compréhension des phénomènes derrière le 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.⁴ L'inflammation pulmonaire se caractérise par une augmentation du nombre et du niveau d'activité des cellules résidentes et circulantes telles que les macrophages, les lymphocytes et les neutrophiles.⁶ 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 exagérée a le potentiel de produire des dommages pulmonaires permanents contribuant à la progression de la maladie et au déclin des fonctions respiratoires.⁴²

La réponse inflammatoire engendre la production et l'accumulation de mucus dans le tissu pulmonaire. Au niveau cellulaire, ce mucus est majoritairement composé de macrophages, de lymphocytes T CD8+ et des neutrophiles.⁴³ Il a été démontré que la proportion de neutrophiles augmente avec la progression de la maladie.⁴⁴ 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.⁴⁵ L'augmentation de ces cellules inflammatoires a été démontrée chez des sujets ayant une MPOC à partir d'une biopsie bronchique comparativement à des sujets témoins non-fumeurs.⁴⁶

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 le leukotriène B4, des cytokines et chimiokines tels que l'IL-6 et l'IL-8 et des protéases

impliquées dans le remodelage tissulaire.⁴⁷ 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.¹ Quelques études ont démontré que la fumée de cigarette serait en mesure de causer toutes ces modifications.⁴⁸⁻⁵⁰

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).⁵¹ Parmi les cytokines augmentées chez les patients ayant une MPOC en période d'exacerbation, il y a l'interleukine-6 (IL-6).⁵² Cette cytokine augmente les niveaux circulants de la CRP en provenance du foie.⁵³ Elle pourrait également être reliée à la dysfonction du muscle périphérique et l'insuffisance cardiaque comme démontrée chez des rats recevant une infusion d'IL-6.⁵⁴ L'élévation des niveaux sanguins de « Tumor Necrosis Factor » (TNF) et de son récepteur soluble (TNFR) ont également été démontrés chez des patients ayant une MPOC.⁵⁵ Cette cytokine peut également contribuer à l'atrophie musculaire.^{56;57} Une des conséquences de l'inflammation est la relâche d'espèces réactives oxygénées (ROS) provenant des cellules inflammatoires activées, qui accentue davantage les dommages aux tissus pulmonaires.^{4;58}

Cependant, il reste à établir si l'accroissement de ces marqueurs d'inflammations systémiques provient de l'inflammation pulmonaire ou s'ils sont reliés à une anomalie tissulaire parallèle. Cette inflammation a le potentiel d'accentuer les manifestations systémiques reliées à une MPOC en plus d'aggraver les manifestations associées aux comorbidités. De plus, l'inflammation systémique peut prématurément diminuer les fonctions pulmonaires.⁵⁹

1.1.4.2 Déséquilibre protéases/antiprotéases

L'absence d'AAT conduit au développement de l'emphysème.⁶⁰ Cette observation a conduit à l'hypothèse voulant que le développement de cette

maladie soit causé par un débalancement quantitatif entre les protéases (ex : neutrophiles élastases, métalloprotéases, cathepsines) et les antiprotéases (ex : AAT, cystatine C).⁶¹ 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.⁶² De fait, la persistance de la réponse inflammatoire augmente le nombre de cellules inflammatoires telles que les macrophages et les neutrophiles pulmonaires.⁶³ Cette réponse est capable d'engendrer un débalancement de l'équilibre protéases/antiprotéases.⁶⁴ 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.⁵⁸ Il a été démontré dans les expectorations de patients ayant une MPOC qu'il existe une corrélation entre le niveau de chimioattractant pour les neutrophiles (IL-8) et les neutrophiles avec une diminution des fonctions pulmonaires.⁶⁵ Il a été démontré chez des sujets ayant une MPOC, que leurs macrophages pulmonaires contiennent une forte concentration de diverses MMP, reconnus pour leur capacité de dégrader les protéines de la matrice extracellulaire comme le collagène et l'élastine.⁶⁶ Dans la MPOC, les MMP les plus fréquentes dans les poumons sont les MMP-1, MMP-2, MMP-9 et MMP-14.^{67;68}

1.1.4.3 Stress oxydatif

Le stress oxydatif est causé par un débalancement 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.⁶⁹ 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 capables de contribuer à leur production.⁷⁰ Il est reconnu que les oxydants peuvent causer des dommages à l'ADN, la peroxydation des lipides et l'oxydation des protéines.⁷¹ 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.⁷²

Sans contredit, la réponse inflammatoire joue un rôle majeur dans les changements physiopathologiques observés dans le tissu pulmonaire. L'inflammation résulte en 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'on obtient une stabilisation voire une amélioration de la fonction pulmonaire, la réponse inflammatoire amorcée précédemment persistera pour plusieurs années. La réponse inflammatoire est en lien direct avec le remodelage et les lésions pulmonaires qui sont associés avec la bronchite chronique,⁷³ l'obstruction des petites voies respiratoires,⁷⁴ l'emphysème⁷⁵ et l'hypertension pulmonaire.⁷⁶ Outre 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 pour diminuer les effets néfastes sur la qualité de vie.^{77;78} Le tableau 2¹¹ résume les divers traitements dont peut bénéficier un patient en fonction de la sévérité de la maladie. Ces traitements vont d'un bronchodilatateur à courte durée pour les cas légers jusqu'à une oxygénothérapie pour les cas très sévères.

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

Thérapies selon chaque stade de la MPOC		
Stade	Caractéristiques	Traitement recommandé
Tous les stades		<ul style="list-style-type: none"> • Éviter les facteurs de risques • Vaccination contre la grippe
0 : Personne à risque	<ul style="list-style-type: none"> • Symptômes chroniques (toux, expectorations) • Exposition aux facteurs de risques • Spirométrie normale 	
I : MPOC légère	<ul style="list-style-type: none"> • VEMS/CVF < 70% • VEMS ≥ 80% de la prédite • Avec ou sans symptômes 	<ul style="list-style-type: none"> • Bronchodilatateur de courte action lorsque nécessaire
II : MPOC modérée	IIA	<ul style="list-style-type: none"> • Traitement régulier avec un ou plusieurs bronchodilatateurs • Réadaptation pulmonaire • Inhalation de glucocorticoïdes si présence de symptômes significatifs et amélioration des fonctions pulmonaires
	IIB	<ul style="list-style-type: none"> • 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
III : MPOC sévère	<ul style="list-style-type: none"> • VEMS/CVF < 70% • VEMS < 30% de la prédite 	<ul style="list-style-type: none"> • Traitement régulier avec un ou plusieurs bronchodilatateurs • Glucocorticoïdes inhalés si présence de symptômes significatifs et amélioration des fonctions pulmonaires ou exacerbations répétées
	ou	
	<ul style="list-style-type: none"> • VEMS < 50% de la prédite avec insuffisance respiratoire ou insuffisance cardiaque droite 	<ul style="list-style-type: none"> • 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 associés 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.⁷⁹

Tableau 3 Principales comorbidités associées à la MPOC.⁸⁰

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, hyperlipémies, réduction nutritionnelle
Gastro-intestinale	Ulcère, symptômes de reflux gastriques, incontinence fécale
Maladie Rénale	
Articulations osseuses	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. Eur Respir J. 2007 Nov;30(5):993-1013.

Il s'avère qu'une diminution de la fonction pulmonaire, indépendamment du niveau de cholestérol, de l'hypertension et du tabagisme est un risque en soi de développer une maladie cardiovasculaire chez un individu donné.⁸¹ 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.⁸² Les mécanismes reliant la MPOC et les maladies cardiovasculaires ne sont pas bien connus, mais pourraient être reliés à l'inflammation systémique, et ce, même si cette inflammation est présente à un degré modéré.⁸³

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 maladie pulmonaire.⁸⁴ Bien que plusieurs mécanismes aient été suggérés 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 au développement du diabète, pourrait être induite par les composés stéroïdiens couramment utilisés dans le traitement de la MPOC.⁸⁵

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 %.⁸⁶ Il faut noter que cette proportion augmente en fonction de la sévérité de la maladie. Les corrélations existantes entre l'ostéoporose et la MPOC sont ; les mesures anthropométriques, la sévérité de la maladie et l'utilisation d'un traitement aux corticostéroïdes.⁸⁷

1.1.7 Dysfonction musculaire

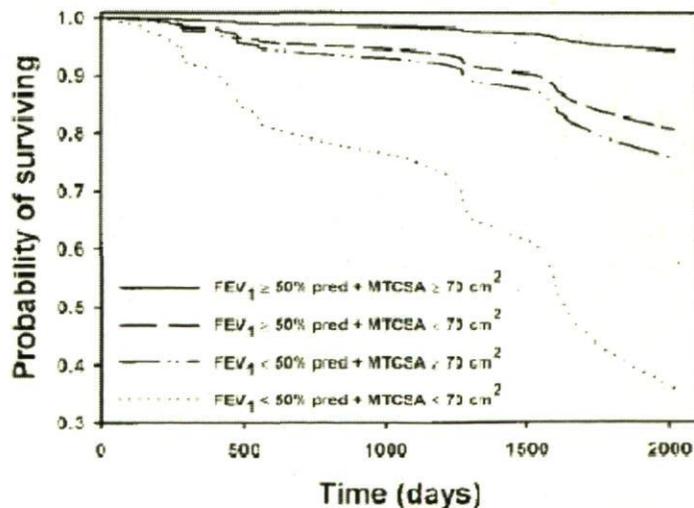
Compte tenu de ses impacts cliniques, la dysfonction musculaire est une des atteintes systémiques les plus importantes de la MPOC. L'atteinte de la fonction musculaire affecte directement et indépendamment la qualité de vie,⁶ la résistance à l'effort,^{88;89} l'utilisation des soins de santé⁹⁰ et le risque de mortalité^{91;92} chez les patients atteints. Ce constat supporte l'intérêt que la communauté scientifique a apporté à ce problème chez les patients atteints d'une MPOC.

Dans la MPOC, la dysfonction musculaire périphérique se caractérise principalement par une modification du métabolisme énergétique en faveur de la

glycolyse,⁹³ un changement dans la proportion du type des fibres musculaires⁹⁴ et une diminution du volume musculaire.⁹⁵ La dysfonction musculaire dans la MPOC atteint davantage les muscles des membres inférieurs que les muscles respiratoires et les muscles des membres supérieurs.⁹⁶ 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.⁹⁷ 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.^{98;99} La faiblesse musculaire a des répercussions importantes sur la capacité fonctionnelle et la tolérance à l'exercice indépendamment de la sévérité de la maladie.¹⁰⁰ Pour plus de 40 % des patients, la fatigue musculaire est le principal symptôme limitant l'exercice et non pas la dyspnée.¹⁰¹ Le stade de la maladie combiné à une faible masse musculaire génère des incidences importantes sur la morbidité et la mortalité comme il est montré à la figure 1.4.⁹¹ Cette figure démontre qu'il y a une nette diminution de la probabilité de survie à long terme pour le groupe de sujets ayant un VEMS \leq 50 % de la prédite et une surface de section du muscle *vastus lateralis* inférieure à 70 cm² comparativement à des sujets ayant un degré d'obstruction semblable et une surface de section du muscle *vastus lateralis* supérieure à 70 cm². De plus, ces patients sont plus susceptibles à une hospitalisation à la suite d'une période d'exacerbation.¹⁰²

Figure 1.4 Courbe de survie de quatre sous-groupes de MPOC séparé en fonction de leurs fonctions respiratoires et de leurs surfaces de cuisses.⁹¹

Abbreviations: FEV₁, Force expiratory volume in one second; MTCSA, Midthigh muscle cross-sectional area.



Plusieurs hypothèses ont été avancées afin d'expliquer le développement de l'atrophie musculaire périphérique observée chez les patients MPOC. Outre l'inactivité physique, d'autres facteurs comme le déficit énergétique, le stress oxydatif, le déficit hormonal, l'hypoxémie et l'altération de la régénération musculaire ont tous été évoqués dans la littérature.¹⁰³ Ces mécanismes seront brièvement abordés dans la section suivante et une attention particulière sera apportée à la régénération du tissu musculaire, sujet principal de ce mémoire de maîtrise.

1.2 L'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 le rôle joué par ces différents processus dans le but de développer des stratégies visant à réduire les effets néfastes sur la capacité fonctionnelle et la qualité de vie que représente cette atteinte. La figure 1.5 démontre bien le nombre et la complexité des différents mécanismes pouvant être impliqués dans le développement de l'atrophie musculaire dans la MPOC. Les principales causes menant à une perte de masse musculaire en dehors du processus normal de vieillissement sont l'inactivité chronique, la malnutrition, le stress oxydatif, le déséquilibre relié à la balance anabolisme/catabolisme, l'hypoxémie et une régénération musculaire déficiente. Ce dernier mécanisme commence tout juste à être étudié et mérite de recevoir notre attention puisqu'il peut-être influencé directement par les différents mécanismes dans le schéma de la figure 1.5.¹⁰³

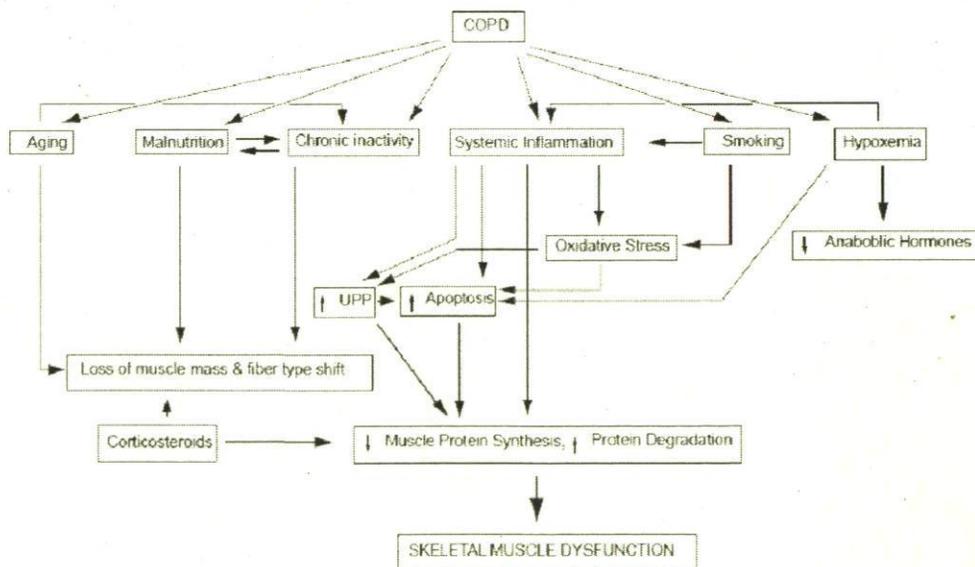


Figure 1.5 Mécanismes proposés pour la perte de masse musculaire dans la MPOC¹⁰⁴
Abbréviations : COPD, Chronic Obstructive Pulmonary Disease; UPP, Ubiquitin Proteasome Pathway.

Les mécanismes conduisant à l'atrophie musculaire ont tous un impact sur la régulation de la fine balance entre la synthèse et la dégradation protéiques. Cette balance fait en sorte que les muscles sont soit en processus hypertrophique ou atrophique, ou bien en phase de maintien. Souvent dans les maladies chroniques, cette balance penche davantage du côté de la dégradation, favorisant le développement de l'atrophie musculaire.¹⁰⁵ Dans la MPOC, il a été démontré que la fonction et la structure du muscle squelettique sont altérées et que la balance nette protéique penche vers la dégradation.¹⁰⁶ Avant d'aborder les mécanismes potentiellement impliqués dans le développement de l'atrophie musculaire dans la MPOC, il est important de survoler les voies de signalisation impliquées dans la synthèse et la dégradation protéique dans le muscle.

1.2.1 Voie de signalisation impliquée dans la synthèse et la dégradation des protéines musculaires

1.2.1.1 Synthèse protéique

Il y a plus d'une voie de signalisation impliquée dans le maintien de la masse musculaire, mais la voie de l'IGF/PI3K/Akt représente celle ayant le plus d'intérêt. Il s'agit de la principale voie régulant la synthèse protéique en plus d'avoir un rôle central dans la dégradation protéique. Cette voie est impliquée dans la synthèse protéique et dans le processus hypertrophique en réponse à des stimuli tels que l'IGF et l'insuline.¹⁰⁷ Au centre de cette voie, il y a la protéine kinase Akt responsable d'une multitude de processus favorisant la survie cellulaire.¹⁰⁸ De manière générale, l'activation de la protéine kinase Akt accentue la synthèse protéique, favorise la différenciation cellulaire et inhibe la synthèse de signaux proapoptotiques.¹⁰⁹ L'activation de cette kinase peut résulter en l'activation de « mammalian Target of rapamycin » (mTOR), l'inhibition de la glycogène synthase kinase-3 β (GSK-3 β),¹¹⁰ du Bcl-associated death promoter (BAD), de la cysteinyl-aspartate-cleaving protease 9 (caspase-9) et des Forkhead box of the class O (FoxO). 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

Il est normal de retrouver dans une cellule musculaire un certain niveau de dégradation protéique. On estime à environ 1 à 2 % des noyaux qui sont remplacés quotidiennement suite à un usage normal.¹¹¹ Il faut donc s'attendre à ce que les fibres musculaires les contenant soient également cibles d'un renouvellement. La voie de signalisation de l'ubiquitine-protéasome est responsable de la majorité de la dégradation protéique musculaire et d'un moindre niveau, on retrouve le système des lysosomes, des caspases et des calpaïnes.

Le système de l'ubiquitine-protéasome est le système de prédilection pour dégrader les protéines.¹¹² La démonstration de l'augmentation de l'activité des deux ubiquitines-ligases E3 spécifiques aux tissus musculaires, atrogin-1 et MurF1 dans divers modèles d'atrophie musculaire tels que l'urémie, le diabète, la dénervation et l'inflammation systémique^{113;114} ont jeté les bases moléculaires pour expliquer les mécanismes reliés à la dégradation protéique. De fait, une augmentation de ces deux E3 ligases ont été démontrés dans 13 modèles d'atrophie musculaire tant chez les humains que chez les rongeurs.¹¹⁵ La famille de facteurs de transcription FoxO sont les principaux régulateurs de l'expression de ces deux E3 ligases.¹¹⁶ La principale voie de signalisation qui contrôle la famille des FoxO est celle de la protéine kinase Akt.¹¹⁶ 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.¹¹⁷ De plus, la kinase Akt agit sur plusieurs voies de signalisation impliquées dans la croissance,¹¹⁸ la survie cellulaire¹¹⁹ et l'inflammation.¹²⁰

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,¹²¹ la sarcopénie¹²² et la dystrophie.¹²³

Les caspases sont bien reconnues pour leur rôle dans la régulation de l'apoptose.¹²⁴ Une étude publiée en 2004 a permis de démontrer l'implication de la caspase-3 dans la dégradation protéique musculaire.¹²⁵ Dans ce rôle, la caspase-3 agit en fractionnant l'actomyosine, le complexe protéique formant les myotubes.¹²⁶ Il faut savoir que le protéasome est incapable de dégrader une structure d'actomyosine intacte, puisqu'elle ne peut y entrer à cause de sa grosseur, nécessitant l'intervention de protéases.¹²⁷ 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.¹²⁸

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.¹²⁹ Ces protéases ont comme rôle le fractionnement des protéines du sarcomère pour les rendre accessibles au protéasome.¹³⁰ 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.¹³¹

Les voies de signalisation impliquées dans la synthèse et la dégradation sont complexes et font intervenir une panoplie de médiateurs tels que le TNF, l'IL-6, l'IL-8, l'IGF, l'Insuline et dont plusieurs demeurent inconnus. Une dérégulation d'un de ces médiateurs pourrait avoir d'importantes conséquences sur la masse musculaire et c'est pourquoi il était primordial de les mentionner. Ces médiateurs sont affectés de manière différente dans chaque système impliqué dans la dégradation protéique associés à l'atrophie musculaire dans la MPOC.

1.2.2 L'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,¹³² il est plausible que l'inactivité physique soit impliquée dans l'initiation et le développement de l'atrophie musculaire dans la MPOC.¹³³ La dyspnée et la fatigue limitent les activités quotidiennes, telles que la marche. De fait, les personnes ayant une MPOC ont une distance de marche significativement diminuée de trois fois lorsque comparée à des gens du même âge sans maladie pulmonaire.¹³⁴ Il est démontré que l'inactivité physique contribue à réduire les qualités du tissu musculaire.¹³⁵ Toutefois, une étude chez un modèle animal de MPOC démontre que malgré un niveau d'activité similaire, les animaux malades ont une réduction des capacités oxydatives du tissu musculaire.¹³⁶ Cette observation suggère que des facteurs autres que l'inactivité physique sont impliqués dans le processus d'atrophie musculaire.

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.¹³⁷ Cette dépense d'énergie supplémentaire proviendrait d'un travail respiratoire augmenté en raison de l'obstruction bronchique.¹³⁸ Les patients MPOC dépensent en moyenne 10 % plus d'énergie que des sujets d'âge, de taille et de poids similaire avec une consommation calorique semblable.¹³⁹ L'hyperinflation pulmonaire et l'augmentation de la résistance inspiratoire contribuent à l'augmentation du travail respiratoire résultant en une augmentation de la consommation en oxygène et du métabolisme.^{140,141}

La présence de patients cachectiques ayant une MPOC suggère qu'il existe des anomalies métaboliques chez ces gens.¹⁴² La perte de poids dans la MPOC pourrait être conséquente à l'augmentation de la dépense énergétique qui n'est

pas adéquatement compensée par la consommation de nutriment. Lorsque les réserves énergétiques sont épuisées, les muscles squelettiques sont dégradés afin de fournir les nutriments nécessaires.¹⁴³ Une étude avec des patients ayant une MPOC, a démontré que l'appétit est réduit de 45 % chez les personnes cachectiques comparativement à ceux ayant une masse corporelle normale.¹⁴⁴ De fortes corrélations ont également été établies dans cette étude entre l'appétit et l'indice de masse corporelle, la perte de poids, la résistance aux hormones de croissance et le déséquilibre anabolisme/catabolisme. Les résultats de cette étude suggèrent que la diminution de l'appétit pourrait être impliquée dans le développement de l'atrophie musculaire.¹⁴⁵

Cependant, lorsque des patients ayant une MPOC reçoivent des suppléments nutritionnels pour contrer les effets néfastes de l'atrophie musculaire, aucun gain significatif dans la masse musculaire n'a été noté chez ces personnes.¹⁴⁶ 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 le développement de l'atrophie musculaire.¹⁴⁷ De même, le stress oxydatif est capable d'induire la dégradation des protéines contractiles, un phénomène conduisant à l'atrophie musculaire.¹⁴⁸ Les facteurs reliés à l'inflammation et suspectés de contribuer à ce processus sont le TNF, l'IL-1 β , l'IL-6 et les ROS.

Le TNF est la cytokine reliée le plus souvent dans la causalité entre l'inflammation pulmonaire et l'atrophie musculaire.¹⁴⁹ Le TNF augmente l'activité transcriptionnelle du Nuclear Factor- κ B (NF- κ B) menant à l'augmentation de la dégradation de protéines contractiles via la voie de l'ubiquitine protéasome.^{150;151} En 2006, une étude a relié pour la première fois dans un modèle de souris transgéniques surexprimant du TNF au niveau pulmonaire une atrophie musculaire périphérique. Cette perte de masse musculaire démontre la possible contribution

de cette cytokine au développement de l'atrophie musculaire.¹⁵² Le TNF produit au niveau pulmonaire serait en mesure de se répandre aux tissus par des mécanismes qui restent toujours inconnus. Initialement, il a été démontré chez des patients MPOC cachectiques une concentration plasmatique accrue de TNF,¹⁵³ mais cette différence n'a pu être reproduite ce qui rend difficile d'impliquer le TNF avec l'atrophie musculaire.¹⁵⁴ Cependant, le TNF peut agir directement sur les cellules musculaires en induisant la dégradation protéique tel que démontré *in vitro* sur des lignées cellulaires.¹⁵⁵

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 β . Cette supposition provient du fait qu'une forte association a été trouvée entre le polymorphisme à la position -511 du gène d'IL-1 et la proportion de sujets cachectiques dans une cohorte de patients MPOC.¹⁵⁶ 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 MPOC comparativement à des sujets contrôles.¹⁵⁷ Mais le rôle potentiel de cette cytokine sur la dégradation protéique reste incertain. Cependant, l'IL-6 tout comme le TNF et l'IL-1 β peuvent altérer la régénération musculaire affectant l'homéostasie du tissu musculaire.

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.¹⁵⁸ Cette hypothèse est supportée par la démonstration qu'il y a une augmentation de l'apoptose dans le muscle chez les personnes ayant une MPOC.¹⁵⁹ Le stress oxydatif et l'inflammation sont également en mesure de causer la dégradation de protéines musculaires par l'activation du système de l'ubiquitine-protéasome.¹⁶⁰

L'inflammation et le stress oxydatif sont deux phénomènes physiologiques qui peuvent expliquer en partie le développement de l'atrophie musculaire. L'intérêt envers ces processus provient du fait que le tissu pulmonaire dans la MPOC est

en inflammation. Cependant, les évidences de la propagation de l'inflammation des poumons aux muscles restent à être démontrées.

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.^{161;162}

Une inhibition importante de la synthèse protéique peut être causée par une diminution des facteurs anaboliques conduisant ultimement à l'atrophie musculaire. Il s'agit d'un phénomène observé dans différentes conditions reliées avec une atrophie musculaire telles que le vieillissement,¹⁶³ l'inactivité,¹⁶⁴ l'hypoxémie chronique^{165;166} et l'inflammation chronique.¹⁶⁷ La réponse anabolique des cellules musculaires est principalement modulée par des hormones anaboliques telles que la testostérone, la déshydroépiandrostérone (DHEA), et l'hormone de croissance (GH) via IGF-I.¹⁶⁸⁻¹⁷⁰ Par exemple, un déficit au niveau de la testostérone circulante chez des sujets masculins a été associé avec le cours normal du vieillissement¹⁷¹ et la présence d'une maladie chronique.¹⁷² Une étude a associé la diminution de la force musculaire avec de faibles niveaux de testostérone circulante.¹⁷³ Ce déficit en testostérone, combiné avec de la fatigue ou une diminution d'énergie, est un phénomène fréquemment observé dans la MPOC.^{174;175} Par ailleurs, un supplément en testostérone a permis d'augmenter la masse et la force musculaire des sujets ayant une MPOC, confirmant le rôle primordial de cette hormone chez ces patients.¹⁷⁶

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

1.2.6 L'hypoxémie

L'hypoxie chronique est capable de causer une diminution de la masse musculaire comme démontrée lors d'une expédition à plus de 5000 m d'altitude.

Après huit semaines en altitude, les alpinistes participants ont subi une perte de 10 % de leur masse musculaire.¹⁷⁷

Notre laboratoire a récemment 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.¹⁷⁸ 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.¹⁷⁹ La diminution locale en oxygène peut également conduire à une inflammation locale contribuant à l'atrophie musculaire.¹⁸⁰

Malgré que les patients ayant une MPOC aient souvent des degrés faibles à modérés d'hypoxémie, nous pouvons raisonnablement postuler que ce mécanisme puisse 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 multinucléées hautement différenciées alors que, les myotubes formeront les fibres musculaires. 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 réparation des muscles squelettiques au cours de la vie adulte.¹⁸¹ De fait, les cellules satellites sont responsables de 99 % de la réparation tissulaire à l'âge adulte.¹⁸² Elles sont retrouvées à l'état de quiescence sous la membrane des fibres musculaires.¹⁸³ Les cellules satellites sont activées suite à des bris ou des dommages, lesquels induiront la relâche de signaux dans l'environnement.^{184;185} Suite à leur activation, les cellules satellites devenues myoblastes, prolifèrent et se différencient en myotubes pour réparer ou former une nouvelle fibre musculaire.¹⁸⁶ La figure 1.6 représente les options qui se présentent aux cellules satellites suite à leur activation. Suite à l'activation et la prolifération,

les cellules nouvellement formées peuvent fusionner à une fibre endommagée, en former une nouvelle ou retourner à l'état de quiescence. Une anomalie dans un de ces processus rendra le mécanisme de régénération musculaire déficient. Il est possible qu'un tel phénomène prenne place et contribue au développement de l'atrophie musculaire dans la MPOC. Cette hypothèse sera discutée en détail dans la prochaine section.

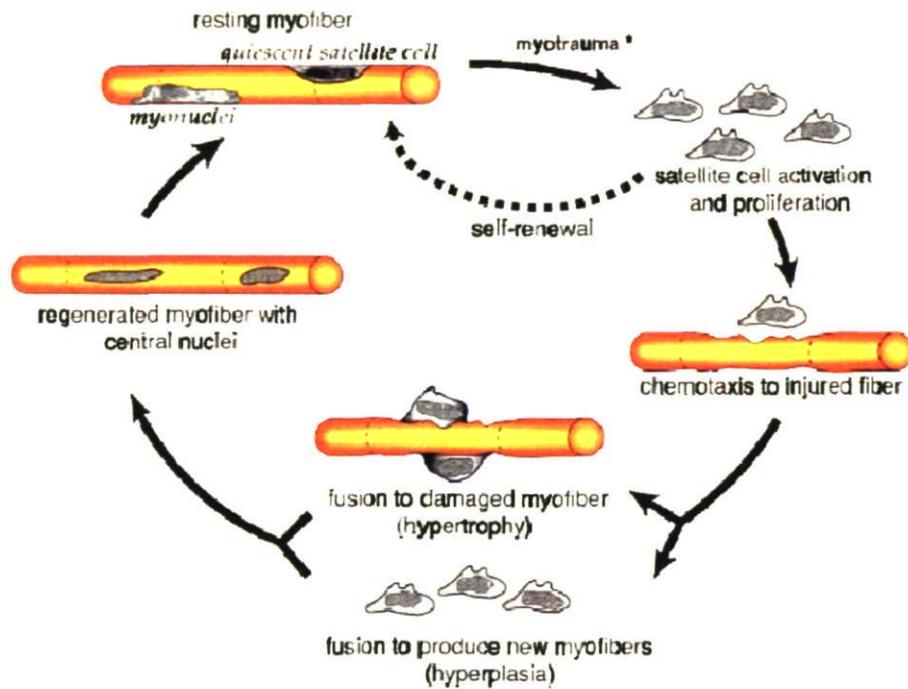


Figure 1.6 Option se présentant aux cellules satellites suite à leur activation. ¹⁸⁷

1.3 Les cellules satellites

Avant d'aborder les caractéristiques physiologiques des cellules satellites, une description de la structure du tissu musculaire squelettique s'impose.

1.3.1 Le 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.¹⁸⁸ Les fibres sont entourées de tissus conjonctifs et regroupées entre elles afin de former un muscle. Les fibres musculaires sont des cellules multinucléées. Les cellules satellites se retrouvent à leur périphérie. Les noyaux musculaires sont également confinés en périphéries de la fibre musculaire.¹ 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.¹⁸⁹ De façon générale, la myosine compose les filaments épais tandis que l'actine compose les filaments fins pour donner naissance aux complexes d'actomyosine.

1.3.2 Généralités

Les cellules satellites ont été identifiées pour la première fois en 1961 par Alexander Mauro.¹⁹⁰ 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.¹⁹¹ 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.¹⁹² Elles comptent pour 2 à 5 % des noyaux retrouvés dans les muscles squelettiques.¹⁹³

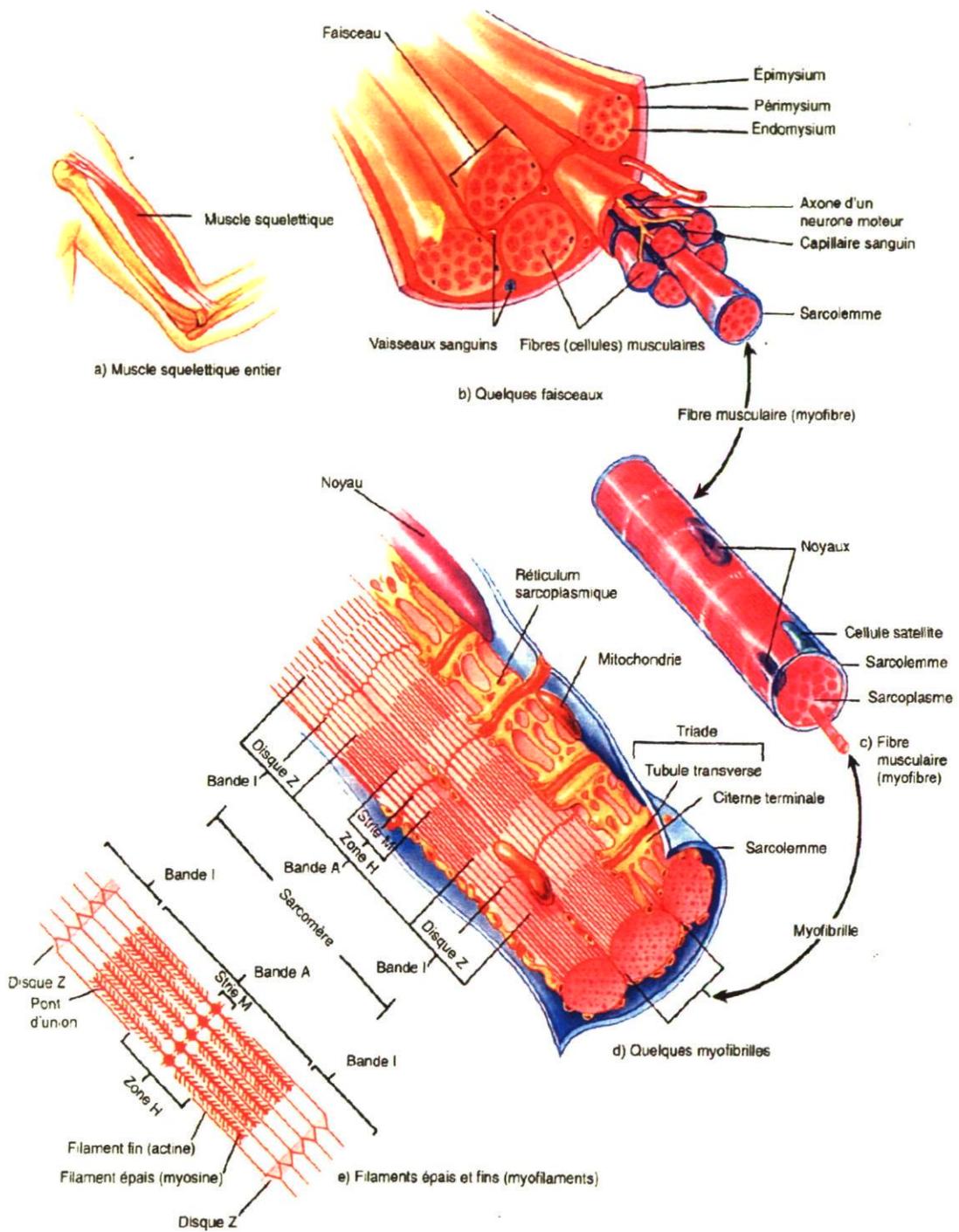


Figure 1.7 Structure macroscopique et microscopique d'un muscle squelettique. ¹

Les cellules satellites constituent le principal réservoir de cellules participant à la régénération du tissu musculaire au cours de la vie adulte.¹⁹⁴ Sous l'influence de différents signaux provenant de l'environnement, les cellules satellites s'activent, prolifèrent et expriment des marqueurs myogéniques.¹⁸⁵ Suite à la prolifération, les cellules satellites prennent l'appellation de myoblastes.¹⁹⁵ 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 ou; 3) fusionner entre elles pour former une nouvelle fibre musculaire (figure 1.7).¹⁸⁵

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.¹⁹⁶ Par la suite, leur nombre se stabilise autour de 5 % durant la vie adulte et diminue à environ 2 % chez la personne âgée.¹⁹⁶ 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.¹⁹⁷ Par exemple, le nombre de cellules satellites dans un muscle oxydatif comme le *soleus* est deux à trois fois plus élevé que dans un muscle glycolytique comme le *tibialis anterior*.¹⁹⁸ De plus, les cellules satellites ont tendances à se regrouper autour des jonctions neuromusculaires,¹⁹⁹ des capillaires²⁰⁰ et des noyaux des fibres musculaires²⁰¹ possiblement pour assurer une meilleure régulation de leurs activités et favoriser la détection des changements de l'environnement.

1.3.3 Formation des cellules satellites

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.²⁰²

Durant le développement, les cellules appelées « myogenic precursor cells » migrent vers les membres inférieurs pendant l'embryogenèse et forment les

muscles squelettiques.²⁰³ Lors de l'embryogenèse, les « myogenic precursor cells » 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.²⁰⁴ Il est intéressant de noter qu'en l'absence de l'expression de c-met au niveau embryonnaire aucune musculature ne se développe.²⁰⁵

Contrairement au postulat précédent, des cellules ayant des propriétés semblables aux « myogenic precursor cells » donnant naissance aux cellules satellites ont été isolées hors des somites lors de l'embryogenèse.²⁰⁶ Ces cellules expriment des marqueurs associés aux cellules endothéliales.²⁰⁶ 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.²⁰⁷ 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.²⁰⁷

De fait, une deuxième population de cellules qui participent à la régénération musculaire a commencé à être étudiée au cours des dernières années.²⁰⁸ Cette population est appelée « muscle side population » dérivée de cellules pluripotentes, les « muscle-derived stem cells ». ²⁰⁸ Ces cellules auraient la capacité de se différencier en cellules hématopoïétiques, qui elles en plus de pouvoir produire toutes les lignées des cellules sanguines, ²⁰⁹ peuvent produire des cellules hépatiques, ²¹⁰ des cellules musculaires cardiaques, ²¹¹ des cellules endothéliales vasculaires ²¹² et différents types de cellules épithéliales. ²¹³ 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. ²⁰⁸ Une deuxième expérience, où des « muscle side population » ont été injectés dans un muscle, ont participé activement à la

régénération musculaire par la formation de myotubes.²¹⁴ 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

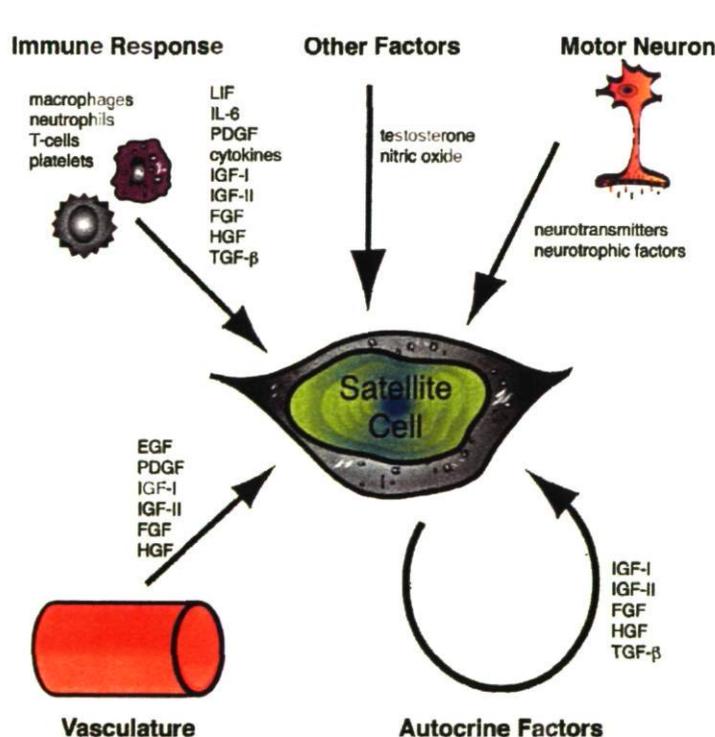
Les blessures musculaires résultent de la désorganisation des filaments d'actomyosine et du déchirement du sarcolemme. Ces déchirures augmentent la perméabilité de la membrane causant un influx intracellulaire de calcium et la libération extracellulaire de créatine kinase.²¹⁵ L'augmentation du calcium intracellulaire est responsable de l'activation des calpaïnes, des protéases dont l'activité est dépendante du niveau de calcium.²¹⁶ L'activation de ces protéases engendre une désorganisation de l'architecture des fibres musculaires.²¹⁷ Au site endommagé, il y a une infiltration séquentielle de neutrophiles et de monocytes, précurseurs des macrophages.²¹⁸ Les cytokines relâchées dans l'environnement par le tissu nécrotique sont un signal chimiotactique pour ces cellules.^{219;220} 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.²²¹ 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 réparation cellulaire.²²² La libération de certaines cytokines et de facteurs de croissance stimule la réparation et la régénération tissulaire via l'activation des cellules satellites.²²³

L'étape initiale de la régénération musculaire est l'activation et la prolifération des cellules satellites.²²⁴ 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 par l'absence de régénération.^{225;226} L'ensemble des nouveaux noyaux provenant des cellules satellites se répartit entre la réparation des fibres endommagées et la formation de nouvelles fibres.²²⁷⁻²²⁹ Les fibres nouvellement formées/réparées sont morphologiquement plus petites et leurs noyaux sont centraux.²³⁰ Ces fibres toujours immatures ont tendance à être basophiles reflétant le haut niveau de synthèse protéique.²³¹ De plus, ces nouvelles fibres expriment spécifiquement la chaîne lourde de myosine embryonnaire.²³² 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.²³³

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 il est illustré à la figure 1.8. Ces signaux proviennent de la réponse 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.^{234;235}

Figure 2.8 Multiples signaux d'activation des cellules satellites.³

Le premier facteur de

croissance très important et qui serait possiblement le premier capable d'induire l'activation des cellules satellites est l'« **Hepatocyte Growth Factor** » (HGF).²³⁶ Le HGF a comme récepteur la protéine c-met qui est exprimée durant l'embryogenèse alors que les cellules sont au stade de « myogenic precursor cells ». La concentration de ce facteur de croissance est proportionnelle au degré de sévérité de la blessure.²³⁶ Le HGF stimule la multiplication des cellules satellites en favorisant leur entrée dans le cycle cellulaire en plus d'inhiber la différenciation cellulaire.^{237,238} 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.²³⁹ Le HGF est également un chimioattractant favorisant la migration des cellules satellites vers les fibres endommagées et la régénération musculaire.^{236,240-243}

Les muscles squelettiques sécrètent l'« **Insulin-like growth factor**» (IGF-1 et -2), deux facteurs de croissance importants dans la régulation de la régénération musculaire.²⁴⁴⁻²⁴⁶ 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.²⁴⁷⁻²⁴⁹ L'importance d'IGF-1 dans la régénération musculaire a été démontrée chez des souris âgées. Suite à l'induction de bris musculaires chez ces souris et de l'injection d'IGF-1 dans les muscles, ces souris ont démontré une meilleure capacité de récupération et une augmentation de leur masse musculaire comparativement à des souris ne recevant pas d'IGF-1.²⁵⁰ Ce facteur de croissance favorise également la survie cellulaire en inhibant l'augmentation de l'apoptose habituellement observée avec le vieillissement.²⁵¹ 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).²⁵²⁻²⁵⁵

Le « **Fibroblast Growth Factor** » (FGF) est un facteur de croissance important dans les premiers stades d'activation des cellules satellites.²⁵⁶⁻²⁵⁸ On

retrouve ce facteur de croissance sous neuf isoformes différentes dont la majorité favorise la prolifération des cellules satellites en plus d'avoir un effet synergique lorsque couplé au HGF.²⁵⁹ Tout comme le HGF, le FGF favorise la prolifération et la multiplication des cellules satellites en inhibant la différenciation.^{260,261} 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.²⁶² Le FGF induit préférentiellement l'activation de la voie de signalisation des MAP/ERK kinases afin de promouvoir la prolifération des cellules satellites.²⁶³

Certains membres du groupe des « **Transforming Growth factors- β** » (TGF- β) 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.²⁶⁴ Une fois activées, ces protéines se transloquent au noyau pour transcrire les gènes cibles.²⁶⁵ De manière générale les membres de la famille du TGF- β exercent un effet d'inhibition sur la prolifération et la différenciation des cellules satellites.²⁶⁶⁻²⁶⁸ Ces facteurs agissent en atténuant l'activation de la myogenèse par l'inhibition de l'expression des membres de la famille des facteurs de transcription tels que MyoD.²⁶⁹ Les membres de la famille du TGF- β sont généralement exprimés à la fin du processus de régénération afin d'empêcher une réponse hypertrophique exagérée.²⁷⁰ Un membre important de cette famille est la myostatine qui est spécifiquement exprimée dans le muscle.²⁷¹ 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.²⁷² 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.²⁷³

La dernière cytokine abordée est l'**interleukine-6** (IL-6) qui est produite par divers types cellulaires incluant les myoblastes et les macrophages.²⁷⁴ 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 réparation afin d'éviter un processus inflammatoire exagéré.²⁷⁵

Plusieurs autres facteurs sont capables d'induire l'activation et la prolifération des cellules satellites. Parmi ces facteurs on retrouve le l'oxyde nitrique (NO),²⁷⁶ le « Platelet-derived growth factors (PDGF)»,²⁷⁷ « l'Endothelial-derived growth factors (EGF)»²⁷⁸ et la testostérone.²⁷⁹ 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 se définit par les étapes auxquelles une « myogenic precursor cells » progresse pour devenir une cellule musculaire. Ces stades cellulaires sont : la « myogenic precursor cells », la cellule satellite, le myoblaste, le myotube et la fibre musculaire.²⁸⁰ Au niveau embryonnaire, les « myogenic precursor cells » se déterminent en cellules satellites et établissent résidence dans les muscles à l'état de quiescence au stade adulte.²⁰³ 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.²⁸¹

Au niveau embryonnaire deux voies de signalisation sont impliquées dans la progression des « myogenic precursor cells » vers le stade de cellule satellite. Ce processus est du ressort de la voie de signalisation Notch et de la voie du Wnt.²⁸² Au niveau adulte, ces voies seront également responsables du contrôle de la myogenèse lors de l'activation des cellules satellites.^{283,284} Ces voies sont induites par des facteurs de transcriptions spécifiques aux cellules satellites tels que Pax7 et Pax3.^{285,286} La protéine Pax7 est membre de la famille des facteurs de transcription « paired-box » impliqués dans le développement des muscles squelettiques des membres, du tronc et du système nerveux central.²⁸⁷ 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.²⁸⁸ Pax3 est un autre membre de cette famille et est pour sa part responsable de la régulation de la spécification des « myogenic precursor cells » en cellules satellites dans les somites durant l'embryogenèse.²⁸⁹ L'expression de Pax7 est primordiale à la fonction et à la survie des cellules satellites.²⁹⁰

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.²⁹¹ 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^{-/-}).²⁹² 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 mutantes 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.²⁹³ De plus, on observe une quasi-absence de régénération musculaire chez les souris Pax7^{-/-} démontrant que les cellules satellites agissent en tant que système principal pour la réparation des muscles endommagés. Donc, suite à l'activation des cellules satellites qui se fait par l'entremise de Pax7 et qui est critique, ces cellules s'engagent dans le cycle cellulaire afin de proliférer en myoblaste.

La spécification de l'identité des cellules satellites en myoblastes requiert l'activité de MyoD et Myf-5, deux facteurs de transcription faisant partie de la famille des « Myogenic Regulatory Factor » (MRF). MyoD et Myf-5 sont spécifiquement exprimées durant la phase de prolifération.²⁹⁴⁻²⁹⁶ 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.²⁹⁷ Il n'est pas encore évident quel facteur essentiel entre MyoD ou Myf-5 est exprimé en premier pour l'engagement dans la

myogénèse, mais rapidement MyoD et Myf-5 seront coexprimées.^{298,299} Le facteur de transcription MyoD joue également un rôle important lors de la différenciation. Cette observation est supportée par un modèle de souris MyoD-/- chez laquelle une diminution du potentiel de régénération est observée. Spécifiquement, une augmentation du nombre de cellules satellites et une diminution de nombre de myotubes suite à l'induction d'une blessure sont rapportées.³⁰⁰

Déterminer le rôle de Myf-5 fut une tâche plus ardue puisqu'aucun modèle de souris n'est viable en l'absence de ce facteur.³⁰¹ Une hypothèse a émané supportant l'idée qu'il ait deux lignées de cellules satellites différentes soit celle exprimant MyoD et l'autre Myf-5.³⁰² 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. Une des lignées représente environ 80 % des cellules satellites et serait celle qui participerait à la régénération.³⁰³ 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.³⁰⁴ Le deuxième scénario serait une division symétrique de la cellule-mère, mais parmi les cellules filles certaines seraient capable de se retirer du cycle cellulaire pour retourner au stade de quiescence.^{305,306} Actuellement, les observations iraient plus en faveur de la division asymétrique avec le facteur de transcription Myf-5 qui aurait un rôle important à jouer dans ce processus.³⁰⁵

Éventuellement, les nouveaux myoblastes amorcent l'expression de deux autres MRF tardifs, la myogenine et MRF4 afin de débiter la différenciation terminale.³⁰⁷ Il s'en suivra l'activation de la protéine p21 qui se chargera de l'arrêt du cycle cellulaire.³⁰⁸ 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.^{309,310} 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 MRF4.³¹¹

Pour une régénération musculaire complète, les myoblastes doivent fusionner entre eux pour former des myotubes. Cette fusion nécessite l'intervention de protéines membranaires telles que les cadherines qui favorisent les contacts cellules-cellules afin de permettre la différenciation et la fusion des myotubes.³¹² D'ailleurs, l'expression de ces protéines est augmentée dans un muscle en phase de régénération musculaire.³¹³

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 nommée « myogenic precursor cell ». Chaque intermédiaire est primordial au bon fonctionnement de la myogénèse pour le maintien de la masse musculaire.

1.3.5 Causes possibles de l'implication des cellules satellites dans l'atrophie musculaire.

La section 1.2.1 a démontré l'importance d'une fine régulation entre la synthèse et la dégradation protéique pour le maintien de la masse musculaire. Un déséquilibre de cette balance conduit à l'atrophie musculaire. L'implication des cellules satellites quant à leur possible contribution dans les processus conduisant à l'atrophie musculaire on jusqu'à présent été peu étudiée. Puisque les cellules satellites sont la principale source de cellules ayant pour rôle le maintien et la réparation du tissu musculaire au cours de la vie adulte, il apparait 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 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.³¹⁴ Plusieurs études ont relié une altération des capacités intrinsèques des cellules satellites et une diminution du potentiel de régénération. Par exemple, une diminution du nombre de cellules satellites, une altération au niveau de leurs capacités prolifératives et une incapacité à se différencier correctement en myotubes sont des hypothèses plausibles.

Premièrement, en ce qui concerne la diminution du nombre de cellules satellites, il s'agit d'une hypothèse difficile à vérifier. D'abord 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. Il faut savoir qu'il y a une diminution généralisée de l'expression des marqueurs pour l'identification des cellules satellites avec l'âge.¹⁹¹ Par exemple, dans le muscle *vastus latéralis* humain, une diminution du nombre de cellules satellites a été observée chez des sujets âgés (70.8 ± 1.3 ans) comparativement à des sujets jeunes (28.7 ± 2.3 ans).³¹⁵ Toutefois, on peut se demander si ce déclin du nombre de cellules satellites a vraiment des conséquences fonctionnelles sur la capacité régénérative. En effet, une cellule satellite soumise à un environnement adéquat et des stimuli appropriés sera en mesure de produire suffisamment de cellules musculaires pour réparer le muscle si l'on se fie à l'étude ayant transplanté des muscles de souris âgées dans des souris jeunes.³¹⁶ Les auteurs ont pratiqué une intervention visant à transférer les muscles atrophiés (*extensor digitorum longus*) provenant de souris âgées à des souris jeunes. Suite à la transplantation, le pourcentage de cellules satellites activées était quatre fois plus important dans les muscles âgés 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 contrôles. Cependant, les muscles de souris âgées transplantés dans les souris jeunes avaient une masse de 144% relativement à leurs contrôles.³¹⁷ Cette dernière expérience démontre

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

Une incompetence à s'activer correctement suite à un stimulus ou à une blessure peut considérablement réduire le potentiel de régénération. Ce phénomène a été observé dans la sarcopénie.³¹⁸ Par exemple, à la suite d'une blessure, l'inflammation persiste 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 incapacité à décoder ces signaux peut considérablement avoir un effet sur la régénération musculaire.

Une incapacité à se différencier en myotube et fusionner correctement aux fibres musculaires est une autre possibilité reliant l'atrophie musculaire et l'altération du potentiel des cellules satellites. Ce dernier phénomène est observé dans la sarcopénie³¹⁹ et dans les dystrophies musculaires.^{320;321} 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. Dans un modèle de souris ayant une inflammation pulmonaire, le TNF a été démontré comme un médiateur altérant le processus de différenciation par la déstabilisation de la protéine MyoD.^{322;323} Il faut se rappeler que MyoD est un facteur de transcription essentiel à la progression d'une cellule satellite vers un myotube et la déstabilisation de la protéine est responsable de la diminution de son activité. Cette baisse d'activité induit une diminution de la régénération musculaire.

Une 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 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 très important puisque l'activation de ces cellules est consécutive à la détection des signaux d'activation qu'elles percevront de leur milieu. Une expérience élégante 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.³²⁴ Lorsqu'il s'agit d'un pairage parabiotique hétérochonique (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 leurs potentiels de régénération, mais la présence de facteurs inhibiteurs ou la diminution des facteurs activateurs dans l'environnement sont responsables de la diminution de l'activité de cellules satellites.³²⁵ Il est possible que l'inflammation systémique probablement présente dans la MPOC puisse rendre l'environnement inadéquat pour l'activité des cellules satellites.³²⁶ L'inflammation est un signal d'activation nécessaire pour l'activation des cellules satellites tel que démontré dans une étude avec des sujets utilisant des anti-inflammatoires et l'absence de réparation musculaire suite à un exercice.³²⁷ Cependant, une trop grande concentration de cytokines inhibent l'initiation de la différenciation des cellules musculaires récemment activées.³²⁶ De fait, la réponse des cellules musculaires aux TNF via la voie du NF- κ B réduit considérablement l'expression de MyoD et l'accumulation de la chaîne lourde de myosine.³²⁸

1.3.5.3 Accélération du déclin des fonctions des cellules satellites

Chaque organisme est doté d'une durée de vie cellulaire dépendante de la capacité de régénération et de réparation des organes et tissus. Avec l'âge, on observe une diminution de cette capacité.^{329;330} Il serait donc plausible qu'une accélération du déclin des fonctions des cellules satellites dans les muscles squelettiques altère le potentiel de régénération.

La diminution du potentiel de régénération observée avec l'âge a jusqu'à présent été associée avec le déclin des fonctions des cellules satellites.³³¹ 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.³³² De tels changements intrinsèques dans les fonctions des cellules satellites acquises avec l'âge ou reliées à une activation extensive 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.³³¹ Des altérations au niveau des intermédiaires de ces voies ont été observées dans la perte de masse musculaire reliée à la sarcopénie.³³³ 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.³³⁴ 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 myogénèse comme celle observée chez des souris jeunes suite à une blessure.³³⁵ Dans cette atteinte, il a été observé un délai dans l'activation des cellules satellites suite à un signal d'activation qui a résulté en une diminution de la réparation musculaire généralement produite.^{336;337}

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 plausiblement causer 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.³³⁸⁻³⁴⁰ L'apoptose est un processus responsable de la mort propre de cellules intactes afin de conserver l'homéostasie entre la croissance cellulaire 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 démontrées 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.³⁴¹ 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,³⁴² la dénervation³⁴³ et l'immobilisation.³⁴⁴ La diminution du nombre de cellules satellites par apoptose et du déclin de leur potentiel de prolifération est responsable de l'altération de la régénération musculaire.^{345;346}

Il est plausible de croire qu'un phénomène de la sorte accentue l'atrophie musculaire dans les muscles squelettiques de patients ayant une MPOC. L'inflammation systémique retrouvée chez ces sujets entraîne un environnement favorable à l'augmentation de la susceptibilité des cellules satellites à l'apoptose. Une augmentation de l'apoptose des cellules satellites contribue à diminuer le nombre de ces cellules pouvant participer à la régénération musculaire.

1.3.5.5 Sénescence répliquative des cellules satellites

L'épuisement du potentiel de régénération des cellules satellites est un phénomène pouvant être causé par une utilisation exagérée des cellules satellites. Cette surutilisation conduisant à l'épuisement du potentiel des cellules satellites est un phénomène observé dans les dystrophies musculaires.

Toutes cellules somatiques ont une durée de vie déterminée par la longueur de leur télomère dû à l'absence de télomérases.³⁴⁷ Les télomères sont une structure non-codante retrouvée à l'extrémité des chromosomes servant à la protection contre la dégradation des sections codantes de l'ADN et 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.³⁴⁸ 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.³⁴⁹ Ce qui résulte en une diminution de la longueur des chromosomes après chaque division cellulaire. Lorsque la longueur des télomères atteint entre 5 à 7 kbp les cellules deviennent sénescents et ne participent plus à la régénération musculaire.³⁵⁰ Dans la dystrophie musculaire de Duchenne, l'épuisement du potentiel de régénération des cellules satellites est la principale explication de la progression fulgurante de la maladie. La fragilité des muscles causée par l'absence de la 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 de la longueur des télomères qui culmine en la sénescence répliquative et diminue le nombre de cellules satellites pouvant réparer le tissu musculaire.³⁵¹ Il s'agit d'un cas extrême, mais démontre que l'épuisement du potentiel de régénération des cellules satellites est un mécanisme qui cause une atrophie musculaire périphérique. De plus, chez les athlètes expérimentant de la fatigue induite par l'exercice, il a été observé une diminution significative de la longueur des télomères des cellules musculaires.³⁵² La diminution de la longueur des télomères cause la sénescence répliquative empêchant d'ultérieures divisions cellulaires. 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.³⁵³

1.4 Objectifs et hypothèses de recherche

1.4.1 Objectifs et hypothèses de recherche

L'atrophie musculaire périphérique est une conséquence importante de la MPOC diminuant la qualité de vie et la survie des patients. L'atrophie musculaire dans la MPOC 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. La régénération tissulaire est un phénomène jouant un rôle dans le maintien de la masse musculaire. Un dérèglement de cette fonction pourrait contribuer au développement de l'atrophie musculaire. Présentement, il n'existe aucune donnée sur l'implication des cellules satellites, principaux acteurs dans la régénération musculaire, dans cette atteinte.

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.

Nous avançons comme hypothèse que le potentiel de régénération, qui est du ressort des cellules satellites est altéré dans les muscles squelettiques périphériques des patients ayant une MPOC.

L'objectif général de ce projet de maîtrise était de développer un modèle de culture primaire et de caractériser les cellules satellites isolées à partir de biopsie humaine provenant du *vastus lateralis* de patient ayant une MPOC.

Les objectifs spécifiques étaient de :

- 1) *Développer un modèle de culture primaire* de cellules musculaires provenant de sujets ayant ou non une MPOC.
- 2) *Confirmer le phénotype musculaire des cellules isolées* des biopsies en immuno-histochimie à l'aide du marqueur spécifique aux cellules satellites Pax7.
- 3) *Évaluer le potentiel de prolifération des cellules satellites* isolées par leur dénombrement en culture sur une période de 96 heures.
- 4) *Évaluer le potentiel de différenciation des cellules satellites* en culture par la quantification de la chaîne lourde de myosine en immuno-empreinte suite à des extractions protéiques sur une période de 7 jours de différenciation.

L'implication des cellules satellites dans différents modèles d'atrophie musculaire a souvent été citée dans la littérature, mais n'a jamais été vérifiée chez les sujets développant une MPOC ce qui amènera des informations considérables dans le domaine.

1.5 Méthodologies

1.5.1 Modèle et méthodologies utilisés

Afin de vérifier notre hypothèse concernant l'implication des cellules satellites dans l'atrophie musculaire chez les personnes ayant une MPOC nous avons premièrement développé un modèle de culture primaire. Ce modèle a en premier lieu été développé avec des muscles de rats et de souris afin d'établir les bases du protocole.

La première année de ce projet a donc été consacrée presque entièrement au développement et à la mise au point de cette technique. Cette technique fut par la suite testée sur des échantillons de muscle humain provenant de biopsie du *vastus latéralis* afin d'établir les conditions optimales. Par la suite, nous devons confirmer le phénotype des cellules isolées obtenues à partir du protocole établi. Cette étape était essentielle puisqu'elle assurait que les cellules en culture étaient des cellules musculaires. De plus, nous avons étudié le comportement de ces cellules suite à diverses stimulations afin de vérifier si elles répondaient aux stimuli et si elles se comportaient comme des cellules musculaires. Enfin, nous avons enclenché l'étape de caractérisation par l'évaluation du potentiel de prolifération, du potentiel de différenciation à partir de biopsie mise en culture provenant du groupe MPOC et témoin.

Au cours de ce projet, plusieurs techniques ont été utilisées. Parmi celle-ci, la biopsie à l'aiguille selon la méthode décrite par Bergström³⁵⁴ a été le moyen retenu pour prélever nos échantillons de muscles sur les sujets participants. Il s'agit d'une méthode invasive locale pratiquée par un médecin qui permet d'obtenir une bonne quantité de muscle sans affecter la qualité du tissu. Par ailleurs, il s'agit d'une intervention régulièrement pratiquée dans notre laboratoire.³⁵⁵

Par la suite le muscle était transporté aseptiquement jusqu'à la hotte à flux laminaire afin d'isoler les cellules satellites pour les mettre en culture selon un protocole³⁵⁶ qu'il a fallu adapter aux tissus humains. Pour ce qui est des

conditions de cultures, le milieu DMEM low glucose supplémenté de 20% de sérum foetal de bœuf s'est avéré le milieu de croissance optimal tandis que le milieu DMEM low glucose supplémenté de 2% de sérum de cheval a été utilisé pour induire la différenciation des myoblastes en myotubes. La filtration et la technique de pre-platage sont deux techniques qui ont été utilisés afin d'augmenter la pureté des cultures. La pureté des cultures a été vérifiée en immunohistochimie contre le facteur de transcription Pax7 spécifiquement exprimé par les cellules satellites.

Le potentiel de prolifération des cultures a été déterminé par compte cellulaire avec un hématimètre. Il s'agit d'une lame capable de contenir un volume précis sur laquelle on retrouve un grillage permettant de compter les cellules par volume. Le potentiel de différenciation a été analysé par la quantification de la chaîne lourde de myosine en immunobuvardage. La quantité de cette protéine reflète le niveau de différenciation des cellules en cultures.

La mise au point et la caractérisation de ce modèle apporte de nouvelles données sur les cellules satellites provenant de malades pulmonaires, ce qui n'avait jamais été fait auparavant. L'étude de la régénération musculaire avec des lignées cellulaires traditionnelles n'aurait pas permis de vérifier l'hypothèse selon laquelle la régénération musculaire est altérée chez les personnes développant une atrophie.

Chapitre 2

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF PERIPHERAL MUSCLE SATELLITE CELLS FROM PATIENTS WITH CHRONIC OBSTRUCTIVE PULMONARY DISEASE.

Chapitre deux – Article scientifiques

2.1 Isolation and characterization of peripheral muscle satellite cells from patients with chronic obstructive pulmonary disease.

2.1.1 Résumé

LE POTENTIEL DE RÉGÉNÉRATION DU MUSCLE PÉRIPHÉRIQUE EST-IL ALTÉRÉ DANS LA MPOC?

OBJECTIF : La maladie pulmonaire obstructive chronique (MPOC) est caractérisée par une obstruction bronchique irréversible et progressive. L'atrophie musculaire périphérique est fréquente dans la MPOC et a un impact négatif sur la qualité de vie, la capacité fonctionnelle et la survie des sujets atteints. Un déficit dans la régénération du tissu musculaire pourrait contribuer au développement de l'atrophie musculaire mais n'a jamais été directement évalué chez les sujets ayant une MPOC. La maintenance et la réparation du tissu musculaire est du ressort des cellules satellites. Un nombre insuffisant de cellules satellites combiné ou non à un processus de multiplication et de différenciation déficient pourrait altérer la capacité du tissu musculaire à récupérer adéquatement suite à l'exercice physique ou à un dommage musculaire. Nous proposons l'hypothèse que le potentiel de régénération est déficient chez les patients ayant une MPOC comparativement à des sujets sains d'âge similaire, contribuant ainsi au développement de l'atrophie musculaire observée chez ceux-ci.

MÉTHODES et RÉSULTATS : Afin de tester notre hypothèse, nous avons développé un modèle de culture primaires des cellules satellites musculaires provenant de biopsies de sujets ayant ou non une MPOC afin d'établir le phénotype de ces cellules en culture. Au stade de myoblaste, les cellules étaient positives pour le facteur Pax7, marqueur spécifique des cellules satellites musculaires. En processus de différenciation, les myotubes exprimaient la chaîne lourde de myosine, une protéine contractile retrouvée dans le tissu musculaire. Ce modèle sera par la suite utilisé afin d'évaluer 1) le nombre de cellules satellites présentes dans chaque biopsie; 2) leur potentiel de régénération en mesurant leur

vitesse de prolifération et; 3) leur capacité à se différencier en myotubes en identifiant la présence de protéines clé tel que la MyoD, MRF4, Myf-5 et la myosine.

CONCLUSION : Ce projet permettra pour la première fois de caractériser les cellules satellites musculaires provenant de biopsies de patients ayant une MPOC et d'évaluer leur potentiel de régénération. De plus, ce modèle pourra être utilisé pour répondre à différentes questions associées à la signalisation musculaire propre à la MPOC.

2.1.2 Title page

Isolation and characterization of peripheral muscle satellite cells from patients with chronic obstructive pulmonary disease.

Marie-Eve Thériault¹, Marc-André Caron¹, Bruno B. Lemire¹, Marie-Ève Paré¹, François Maltais¹, Richard Debigaré^{1*}

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

*Corresponding author

Financial support: R. Debigaré is a Research Scholar of the Fonds de la Recherche en Santé du Québec. This work was supported by a research grant from the Canadian Lung Association

Running title: Satellite cell in COPD

Keywords: COPD, skeletal muscle, atrophy, satellite cells, regeneration

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

2.1.3 Abstract

RATIONALE: Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD) is often associated with peripheral skeletal muscle atrophy decreasing the quality of life and functional capacity in affected individuals. To this date, biochemical pathways triggering loss of muscle mass have been directly studied from human biopsies. However, satellite cells, the primary source of myogenic precursor cells contributing to the mechanism of regeneration and repair during adulthood, as not been studied in this disease.

METHODS: To substantiate the hypothesis that satellite cells from COPD patients have an impaired regenerative potential, we developed a model of primary cell culture to assess their possible role in muscular atrophy. Impaired skeletal muscle satellite cells function affecting activation, proliferation and differentiation could ultimately participate in the atrophying process in COPD patients. We recruited eight patients with moderate-to-severe airflow obstruction and four control subjects with normal lung function to undergo muscle biopsies of the *vastus lateralis*.

RESULTS: First, we confirmed the muscular phenotype of the cultured cells in both groups. Undifferentiated cells were positive for paired box transcription factor Pax7, a specific marker for muscle satellite cells. Differentiated muscle cells also expressed Myosin Heavy Chain (MHC), a major contractile protein in muscle tissue. Muscle cells from patients with COPD took 7.25 ± 0.25 days to first accumulate in the culture dish while it took only 5.50 ± 0.29 for control biopsies ($p < 0.05$). Second, we sought to determine if the proliferation potential was determinant in this altered activation by profiling cells over a period of 96 hours. An increase number (31.7%, $p < 0.01$) of cells isolated from COPD patients were found at 96 hours. We observed an altered differentiation process in cells from COPD patients compared to control subjects, revealed by the attenuation in MHC protein expression. There was a reduction of 44.9% ($p < 0.1$), 43.5% ($p < 0.1$) and 48.1% ($p < 0.1$) at day 5, 6 and 7 respectively in MHC protein expression during differentiation.

CONCLUSIONS: Based on our results, we conclude that i) growing satellite cells from peripheral skeletal muscle is possible ii) COPD patients seem to have an

impaired proliferation potential compared to control subjects. To the best of our knowledge, this is the first reported model of primary muscle cell culture obtained from the *vastus lateralis* of patients with COPD. This model will be a future asset to study regenerative potential in various cases of muscle atrophy.

2.1.4 Abbreviations

AIDS	Acquired Immunodeficiency Syndrome
BMI	Body mass index
COPD	Chronic Obstructive Pulmonary Disease
DLCO	Diffusing capacity of carbon monoxide
DMD	Duchenne Muscular Dystrophy
DMEM	Dulbecco Modified Eagle Medium
FEV1	Force Expiratory Volume in 1 second
FGF	Fibroblast Growth Factor
FVC	Forced Vital Capacity
HGH	Hepatocyte Growth factor
IL	Interleukine
MRF	Myogenic Regulatory Factor
Myf-5	Myogenic Factor 5
NCAM	Neural Cell Adhesion Molecule
Pax	Paired-box
PBS	Phosphate-Buffered Saline
RV	Residual Volume
TLC	Total Lung Capacity
TNF	Tumore Necrosis Factor

2.1.5 Introduction

Skeletal muscle atrophy is often associated with a variety of acute and chronic conditions such as acquired immunodeficiency syndrome (AIDS),¹ diabetes,² chronic heart failure (CHF)³ and chronic obstructive pulmonary disease (COPD)⁴. In COPD, muscle mass loss can have a dramatic impact on quality of life⁵ and can lead to premature death.⁶ Many factors have been suggested to cause skeletal muscle atrophy such as inactivity, oxidative stress, inflammation, catabolic/anabolic imbalance and hypoxemia (ref). Muscle mass maintenance is obtained by the delicate and dynamic balance between protein synthesis and degradation. In many atrophying conditions, including COPD,⁷ protein degradation surpasses protein synthesis.

Muscle tissue is mainly composed of multinucleated myofibers which are the functional contractile units of skeletal muscle. Satellite cells are a cell population present in muscle tissue and represent the primary source of myogenic precursor cells contributing to the processes of maintenance, hypertrophy and repair of muscle tissue after birth. Satellite cells, under quiescent state, are found on the surface of muscle fiber between the plasmalemma and the basal lamina.⁸ Upon activation following a proper stimulus⁹ coming from crushed myofibers, invading macrophages,¹⁰ connective tissue⁹ and neurons¹¹, they proliferate into myoblasts and migrate to the requested site. In the activated state, satellite cells express a specific paired box transcription factor, Pax7, which will lead to the cell cycle entry by the expression of myogenic regulatory factors (MRF) such as MyoD and myf5.¹² Eventually, newly formed myoblasts will exit the cell cycle in order to differentiate into myotubes and fuse to injured myofibers for repair or fuse together to form a new one.¹³ In order to preserve an adequate population of muscle satellite cells during adulthood, some newly formed myoblasts will return to the quiescent state.^{14;15} Muscle mass maintenance relies on the delicate regulation between protein turnover and the addition of new myonuclei from satellite cells. An impaired regenerative process in muscle tissue is likely to contribute to the development of muscle atrophy.^{16;17}

An increase degradation process concomitant with a consistent decreased ability of muscle tissue regeneration following injury or overuse due to satellite cells impairment could contribute to muscle mass loss in COPD. To the best of our knowledge, satellite cells have never been studied *in vitro* in the context of COPD. The purpose of this study was to collect culture and characterize satellite cells from the peripheral muscle of COPD patients. This methodological development is essential to allow future experimentations on the regenerative potential of satellite cells isolated from patients with COPD.

2.1.6 Materials and Methods

Subjects. Four male subjects with normal lung function and eight male patients with COPD were recruited for this study. The diagnosis of COPD was based on a past smoking history (> 20 pack-year) and pulmonary function testing showing decreased airflow obstruction (forced expiratory volume in 1 s [FEV₁] < 60% of predicted value and FEV₁/forced vital capacity [FVC] < 70%). All patients with COPD were in a stable condition at the time of the study and were not suffering from cardiovascular, neurological, muscular, or any other diseases that could alter satellite cells behavior. Subjects were not using oral corticosteroids or any other medication that could interfere with satellite cells physiology. The institutional ethics committee approved the study protocol and each patient signed a written informed consent form.

Muscle biopsy. Needle biopsies of the quadriceps, performed as described by Bergström²⁷ and routinely done in our laboratory²⁸ were obtained.

Satellite cells isolation and culture. After muscle biopsy, the sample was placed in a sterile plate filled with phosphate-buffered saline (PBS), covered and transported on ice under sterile cell culture hood. Muscle samples were minced into a slurry using a scalpel and subjected to enzymatic digestion for 1 h with 0,1% collagenase (Cedarlane, Hornby, ON, Canada) and 0,1% dispase (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA) at 37°C with gentle agitation. The digested muscle specimens were then dissociated by triturating them several times and filtered through a 100 µm filter (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA). Cells were plated and grown on collagen coated dishes (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO, USA) 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% CO₂ 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 were captured with a Nikon 950 digital camera (Nikon Corporation, Tokyo, Japan).

Immunohistochemistry. To determine cell culture purity, Pax-7 (R&D Systems, Minneapolis, NE, USA) staining, a specific satellite cells transcription factor, was performed. Similarly, presence of fibroblast was detected using Ab-1 (EMD Biosciences, La Jolla, CA, USA), a membrane protein present in these cells but not in satellite cells. Immunohistochemistry was performed using Vectastain Elite ABC Kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) according to the instructions provided by the manufacturer. After the first passage, 5×10^4 cells were plated on 2-chamber slides which were fixed two days later with ice-cold acetone and methanol 60/40 (v/v) at -20°C for 20 minutes, washed with PBS, incubated with a blocking solution (HS 1%) for 1 hour and incubated with the primary antibody overnight at 4°C in a humidified chamber. Excess of primary antibodies Pax-7 and Ab-1 were cleaned with PBS then slides were incubated with biotinylated antibody for 30 minutes, washed with PBS and then incubated with avidin biotinylated-peroxidase complex for 40 minutes, followed by reaction with diaminobenzidine (Dako, Glostrup, Denmark). This peroxidase chromogen substrate was used to visualize the bound antibody by producing brown staining of cells. Slides were analyzed and images were captured using a Nikon Eclipse E600 microscope (Nikon Corporation).

Proliferation assay. After the first passage, cells were plated at a density of 5×10^4 cells on a 60mm cultures dish. Every 24h, cells were trypsinized and counted using a hemacytometer for four successive days.

Differentiation assay. To measure differentiation rate, after the second passage 2×10^5 cells were placed in 60 mm dish. Near confluent myoblasts were placed in differentiation medium as previously described for seven consecutive days. Whole cell lysates were prepared every 24 h until 7 days of differentiation

and immunoblotting against Myosin Heavy Chain (MHC) was performed. To prepare whole cell lysates, cells were washed with ice-cold PBS. Cells were then lysed in a lysis buffer [10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl, 2mM EDTA, 2% Triton X-100, protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich), phosphatases inhibitor cocktail 1 and 2 (Sigma-Aldrich)] for 20 minutes on ice. Extracts were centrifuged at 12000 rpm for 10 minutes. Supernatants were kept at -80°C for further analysis. Protein concentration was determined using Bio-Rad DC protein assay (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA).

Western Blot analysis. Western blot analyses were performed using 10 µg of whole cell extracts. Immunoblotting with anti-MHC (Sigma), anti-NCAM (R&D systems) and anti-Pax7 (R&D systems) were performed using standard SDS-PAGE procedures. Proteins were detected using a secondary antibody coupled with horseradish peroxidase (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA). The antigen-antibody complexes were revealed using Western Lightning Chemiluminescence Reagent Plus (PerkinElmer LAS, Inc., Boston, MA, USA).

2.1.7 Results

Subjects characteristics

Eight patients with COPD and four healthy controls agreed to participate in this study. Patients and control did not significantly differ regarding age, sex and body mass index. Anthropometric characteristics and pulmonary function data are provided in table 1. On average, patients had moderate-to-severe airflow obstruction, with a mean FEV₁ of 37 ± 4 % predicted value. Six patients had stage II disease according to the GOLD classification and the two remaining patients had stage III disease. As expected, lung function tests were normal in all control subjects.

Isolation and characterization of primary muscle cells

In order to be able to study the relevance of satellite cells in the atrophying process observed in patients with COPD, a model of primary cells cultures obtained from human biopsy had to be developed. As seen in figure 1, we succeeded in growing muscle cells from biopsy taken from both groups of subjects. Those cells demonstrate a myoblast-like and myotubes-like shape in growing and differentiation process respectively. Positive staining for Pax7 (figure 2 - 3) and NCAM (figure 3) confirmed the phenotype of these cells as being satellite cells. Accordingly, ~95% of freshly isolated muscle progenitor cells were classified as satellite cells, while ~5% of the cells expressed markers consistent with fibroblast phenotypes (Data not shown).

Delay in satellite cells apparition from patient's biopsy

When cell specimens were plated for the first time, a delay in satellite cells apparition has been observed in cells cultured from patient's biopsy. Cells from these patients took 7.25 ± 0.25 days to appear compared to 5.50 ± 0.29 days ($p < 0.05$) for cells coming from control subject biopsy.

Lower multiplication of satellite cells isolated from COPD patients.

When plated, cells were allowed to reach 70% confluence and at this time trypsinization was performed for further multiplication. Every passage, cells were systematically counted. As shown in table 2, satellite cell isolated from COPD patient has a tendency to produce less myoblast between each passage compared to controls. The number of cells counted in COPD was 43%, 21% and 28% lower in cell at the first, second and third passage, respectively.

Cell proliferation is similar between patients with COPD and control.

Cell proliferation was evaluated by counting growing cells every 24 hours over a 96 hours period. For this experiment, each culture dishes were seeded with 5×10^4 cells. Cells were collected every 24 hours and counted. The number of cells at each time point is presented in figure 4. For the first 72 hours, no significant difference was observed in cell proliferation curve between groups. However, significant decreased in cell proliferation was observed in COPD compared to controls at 96 hours ($p < 0.01$).

Impaired differentiation in COPD patients

Then the capacity of myoblast to differentiate into myotube was determined by quantifying the Myosin Heavy Chain protein over a period of 7 days in differentiation. The MHC protein quantification using densitometry analysis at each time point is presented in figure 5. There is a slight tendency ($p \square 0.1$) of a decrease MHC expression at day 5, day 6 and day 7 even if there no significant change. More patients will be needed to demonstrate this difference.

2.1.8 Discussion

One of the most striking consequences of COPD is the reduction of muscle mass resulting in loss of endurance and strength.^{18;19} It has been difficult to establish a primary cause and to formulate an exclusive hypothesis explaining the molecular basis behind this process. Although, the role of protein imbalance, hypoxia, inactivity, inflammation, oxidative stress have all been extensively studied, the role of muscle regeneration in atrophying COPD patients has not been investigated. In the present study we sought to determine the contribution of satellite cells to peripheral skeletal muscle atrophy in COPD patients. Muscle regeneration after injury or in response to hypertrophic signalling requires the activation of satellite cells.²⁰ Upon activation, these cells migrate at the injured site, proliferate to form a sufficient pool of myoblasts, which later differentiate and fuse to form myofibers. This well coordinated and regulated process was found to be essential for effective muscle regeneration and is termed as myogenesis.²¹ In order to study muscle regeneration, we develop a model of primary muscle cell culture from muscle biopsies taken in patients with COPD and healthy controls.

This study shows for the first time the possibility to growth satellite cells *in vitro* from peripheral skeletal muscle of COPD patients. Satellite cells are estimated to account for 99% of muscle regeneration during adulthood indicating the importance to study those cells.²² The first objective was to performed morphological and phenotypical characterization of cultured cells in order to ensure the muscular phenotype. Those cells were confirmed as muscle cells by the expression of specific marker such as Pax7, MHC and NCAM. Moreover, the absence of anti-human fibroblast surface protein (ab-1) excluded the possibility that these cells were in fact fibroblast, a common contaminant in primary cell culture. The expression of the cellular adhesion molecule NCAM, the paired-box transcription factor Pax7 and the motor protein MHC in the cultured cells were detected by Western blot. Pax7 transcription factor is expressed selectively in quiescent and proliferating satellite cells. In the current study, there were 95% of cells positive for Pax7 at the time of isolation ensuring the quality of methodology use.²³ NCAM is essential in myoblast signalling for adhesion and fusion.²⁴ In

accordance with previous report, expression of those markers indicates the myogenic capacity of isolated cells.^{25,26} Moreover, primary isolated satellite cells had a myoblast-like and myotube-like morphology.

In order to sustain an appropriate regenerative function, satellite cells have to be activated which allows them to initiate proliferation and further multiplication leading to muscle fiber repair. In our study, we observed a delay in satellite cells accumulation. This delay could be interpreted as a defect in the activation process. A harmful environment could explain the delay in satellite cells accumulation in cells culture from COPD patients. The environment is known for its critical role in this process of activation and proliferation. 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. Systemic environment specifically found in COPD patients²⁷ could impair satellite cell activity resulting in muscle regeneration defect. This altered activation capacity could be problematic after injury if inhibitory factors counteract stimulatory factors. An increase concentration of inhibitory factors altering myogenesis could endanger muscle regeneration.

On the other hand, producing sufficient myoblast following activation is another critical step for muscle repair. Data obtain from this study demonstrated that cells quantification from COPD patient cultures had a tendency to be less compared to control subjects between each passage. By extrapolation from table 3, every time one satellite cell will be activated in COPD skeletal muscle, it will only produce six progenitors instead of ten for the control subjects. This reduced production of progenitor cells in response to the activation signal could have severe long term repercussion on muscle mass maintenance. Several hypotheses have been suggested to explain this decline such as an increase susceptibility to apoptosis²⁸ or senescence. Possibly, satellite cells from COPD patients are susceptible to an early decline in intrinsic capacity due to premature damage and an increase number of regeneration and repair cycles. In healthy skeletal muscle,

satellite cells capacity remains constant independent of the weekly turnover until the normal decline associated with aging takes its toll.

To further characterize human satellite cells, we measured the proliferation rate between cells cultured from COPD patients and control subjects. As shown in this study, the delay in the initial accumulation was later compensated by a similar proliferative potential. Once activated, satellite cells from COPD patients seem able to compensate from the delay and produce similar amount of myoblast. This could explain the significant increase at 96 hours on the proliferation curve. Although, the similar proliferation rate was obtained under optimal culture condition, this may not reflect *in vivo* conditions in COPD patients. Satellite cells and progeny controlled their fate in response to signal sensed in their immediate environment. These signals originate from invading cells, resident cells, vasculature and motor neurons which produce growth factors, cytokines and neurotransmitters. Systemic inflammation²⁹⁻³¹ and anabolic/catabolic imbalance³² are often regarded as important factors contributing to peripheral muscle atrophy in COPD patients, but they could also affect satellite cells. For example, in a mouse model of COPD, the TNF expression has been shown to destabilize MyoD protein and in turn reduce regenerative process.³³ An altered activity of myogenic regulatory factors could *in vivo* reduce satellite cells proliferation which cannot be demonstrated *in vitro*.

Moreover, capacity of myoblast to differentiate in myotubes and form new myofibers is the last critical step for muscle regeneration. We provided strong evidence to suggest an altered differentiation capacity as shown by the reduce MHC protein expression profile. This could be explained by the inability of myoblasts to fuse together which is a prerequisite step to engage the late MRF transcription leading to a reduce MHC protein levels.^{34;35} In the Duchenne Muscular Dystrophy (DMD) disease, the absence of the structure protein dystrophin cause muscular fragility and multiple round of repair and regeneration.³⁶ In the first year of the disease, satellite cells are able to sustain the regeneration process until exhaustion. The replicative aging process has long been thought as the cause for exhaustion, until it was establish that an impaired differentiation

process is more likely to cause the reduced regeneration leading to atrophy.^{37;38} DMD is an extreme case of repair and regeneration in which differentiation is compromised leading to a subsequent failure to maintain muscle homeostasis.

Isolation and characterization of primary human myoblast cultures and thereby an understanding in the activation, proliferation and differentiation process from satellite cells to myotubes, might be of clinical relevance in the future in order to treat against muscular atrophy in COPD patients. We observed a delay in accumulation of cultured cells despite a similar proliferation potential from skeletal muscle of COPD patients compared to controls. In addition, COPD cells also had an impaired differentiation process shown by the reduced expression of MHC. Impaired regenerative potential could contribute or accentuate the development of muscle atrophy in patients with COPD. Interestingly, studies involving resistance exercise training have observed a partial restoration of muscle mass suggesting that satellite cell activity is not exhausted. However, based on our results, satellite cell activity may not be fully operational. We successfully developed a primary muscle cell culture protocol in order to characterise satellite cells from a *vastus lateralis* biopsy. Nevertheless, further studies on the intrinsic capacity of satellite cells and their environment need to be performed in order to determine their contribution in the atrophying process and eventually, develop therapeutic interventions which could help maintain or restore muscle mass.

2.1.9 Grants

This work has been supported by an operating grant from the Canadian Lung Association. Marie-Eve Thériault is supported by a scholarship from Réseau en Santé Respiratoire du FRSQ. Richard Debigaré and François Maltais are research scholars of the Fonds de la Recherche en Santé du Québec.

2.1.10 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. Price, S. R., J. L. Bailey, X. Wang, C. Jurkowitz, 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.
3. Anker, S. D., J. W. Swan, M. Volterrani, T. P. Chua, A. L. Clark, P. A. Poole-Wilson, and A. J. Coats. 1997. The influence of muscle mass, strength, fatigability and blood flow on exercise capacity in cachectic and non-cachectic patients with chronic heart failure. *Eur.Heart J.* 18:259-269.
4. 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.
5. 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.
6. 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.

7. 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.
8. Mauro, A. 1961. Satellite cell of skeletal muscle fibers. *J.Cell Biol.* 9:493-495.
9. Charge, S. B. and M. A. Rudnicki. 2004. Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiol Rev.* 84:209-238.
10. Tidball, J. G. 2005. Inflammatory processes in muscle injury and repair. *Am.J.Physiol Regul.Integr.Comp Physiol* 288:R345-R353.
11. Hawke, T. J. and D. J. Garry. 2001. Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology. *J.Appl.Physiol* 91:534-551.
12. Hyatt, J. P., G. E. McCall, E. M. Kander, H. Zhong, R. R. Roy, and K. A. Huey. 2008. PAX3/7 expression coincides with MyoD during chronic skeletal muscle overload. *Muscle Nerve* 38:861-866.
13. 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.
14. Zammit, P. S., J. P. Golding, Y. Nagata, V. Hudon, T. A. Partridge, and J. R. Beauchamp. 2004. Muscle satellite cells adopt divergent fates: a mechanism for self-renewal? *J.Cell Biol* 166:347-357.
15. Collins, C. A. and T. A. Partridge. 2005. Self-renewal of the adult skeletal muscle satellite cell. *Cell Cycle* 4:1338-1341.

16. 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.
17. Jejurikar, S. S. and W. M. Kuzon, Jr. 2003. Satellite cell depletion in degenerative skeletal muscle. *Apoptosis*. 8:573-578.
18. 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.
19. 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.
20. Allen, D. L., R. R. Roy, and V. R. Edgerton. 1999. Myonuclear domains in muscle adaptation and disease. *Muscle Nerve* 22:1350-1360.
21. Mitchell, P. O. and G. K. Pavlath. 2001. A muscle precursor cell-dependent pathway contributes to muscle growth after atrophy. *Am.J.Physiol Cell Physiol* 281:C1706-C1715.
22. Partridge, T. A. 2002. Cells that participate in regeneration of skeletal muscle. *Gene Ther*. 9:752-753.
23. 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.

24. Knudsen, K. A., S. A. McElwee, and L. Myers. 1990. A role for the neural cell adhesion molecule, NCAM, in myoblast interaction during myogenesis. *Dev.Biol.* 138:159-168.
25. Charge, S. B. and M. A. Rudnicki. 2004. Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiol Rev.* 84:209-238.
26. Hawke, T. J. and D. J. Garry. 2001. Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology. *J.Appl.Physiol* 91:534-551.
27. 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.
28. Alway, S. E. and P. M. Siu. 2008. Nuclear Apoptosis Contributes to Sarcopenia. [Article]. *Exercise & Sport Sciences Reviews* 36:51-57.
29. Barnes, P. J. and B. R. Celli. 2009. Systemic manifestations and comorbidities of COPD. *Eur.Respir.J.* 33:1165-1185.
30. 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.
31. Mitch, W. E. and S. R. Price. 2003. Mechanisms activating proteolysis to cause muscle atrophy in catabolic conditions. *J.Ren Nutr.* 13:149-152.
32. 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.

33. 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.
34. Timchenko, N. A., P. Iakova, Z. J. Cai, J. R. Smith, and L. T. Timchenko. 2001. Molecular basis for impaired muscle differentiation in myotonic dystrophy. *Mol. Cell Biol.* 21:6927-6938.
35. Oexle, K. and A. Kohlschutter. 2001. Cause of progression in Duchenne muscular dystrophy: impaired differentiation more probable than replicative aging. *Neuropediatrics* 32:123-129.
36. Webster, C. and H. M. Blau. 1990. Accelerated age-related decline in replicative life-span of Duchenne muscular dystrophy myoblasts: implications for cell and gene therapy. *Somat. Cell Mol. Genet.* 16:557-565.
37. Oexle, K. and A. Kohlschutter. 2001. Cause of progression in Duchenne muscular dystrophy: impaired differentiation more probable than replicative aging. *Neuropediatrics* 32:123-129.
38. Brack, A. S. and T. A. Rando. 2007. Intrinsic changes and extrinsic influences of myogenic stem cell function during aging. *Stem Cell Rev.* 3:226-237.

2.1.11 Figures Legends

Figure 1. Primary muscles cells cultures obtained from a needle biopsy of the *vastus lateralis* from a COPD patient; X 10 magnifications.

Figure 2. Satellite cells stained with Paired box transcription factor 7 (Pax-7) antibodies. Areas of brown diaminobenzidine staining correspond to areas of antibody binding in the nucleus; X 20 magnifications.

Figure 3. Western blot against Pax7 and neural cell adhesion molecule (NCAM) on total protein extract of cells isolated using the primary cells culture protocol and from L6 rat cells line as positive control. Expression of Pax7 is observed in myoblast at the second and third passage. The expression of Pax7 is also seen in myoblast and in a less extends in myotubes. Primary muscle myoblast express the protein NCAM after the second and third passage. L6 myoblast and myotube express the three different isoform of NCAM.

Figure 4. Proliferative potential in cells cultured from COPD patients and control subject. Following the first passage, 5×10^4 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. * Significant different from control ($p \leq 0.01$)

Figure 5.A. Representative Western blot on total protein extract isolated from control subjects (figure 5.1) and from patients with COPD (figure 5.2). Protein extraction was performed every day from the initial day of differentiation to 7 days.

Figure 5.B. Quantification of the Myosin Heavy Chain protein densitometry using Image J is reported as mean \pm SEM from three control patients and from seven COPD patients. ‡ Difference from control ($p < 0.1$).

2.1.12 Figures

TABLE 1 : Subject Characteristics		
Characteristics	Control Subjects (n=4)	Patients with COPD (n=8)
Age	65 ± 4	66 ± 2
BMI, kg/m²	30.7 ± 2.2	28.8 ± 2.0
FEV₁, L	3.1 ± 0.2	1.0 ± 0.1†
FEV₁, % predicted	98.8 ± 2.1	37.0 ± 4.0†
FEV₁ / FVC, %	73.8 ± 2.3	36.5 ± 1.1†
TLC, % predicted	95.5 ± 8.1	118.0 ± 5.5
RV, % predicted	92.8 ± 24.5	163.5 ± 15.9
DL_{co}, % predicted	95.0 ± 3.3	53.3 ± 4.8*

Values are means ± SEM
 * p < 0.05
 † p < 0.001

Definition of abbreviations: BMI = Body mass index; TLC = total lung capacity; RV = Residual volume; DLCO = Diffusing capacity of carbon monoxide.

TABLE 2: Cell number after each passage

Values in millions ± SEM	Control n=4	COPD n=8
Passage 1	1.27 ± 0.38	0.72 ± 0.12 ‡
Passage 2	3.86 ± 0.51	3.06 ± 0.22 ‡
Passage 3	4.93 ± 1.54	3.57 ± 0.27 ‡

Values are means ± SEM
‡ p < 0.1

Figure 1.

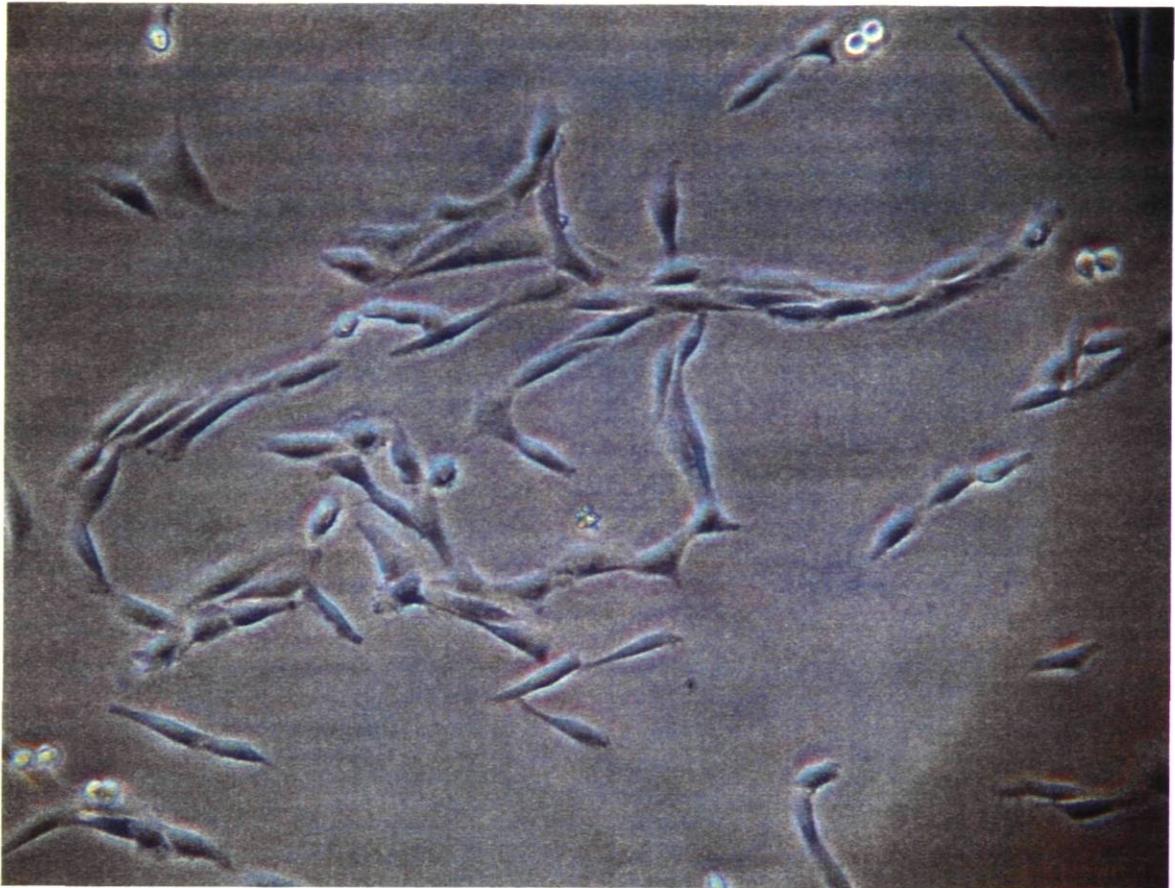


Figure 2.

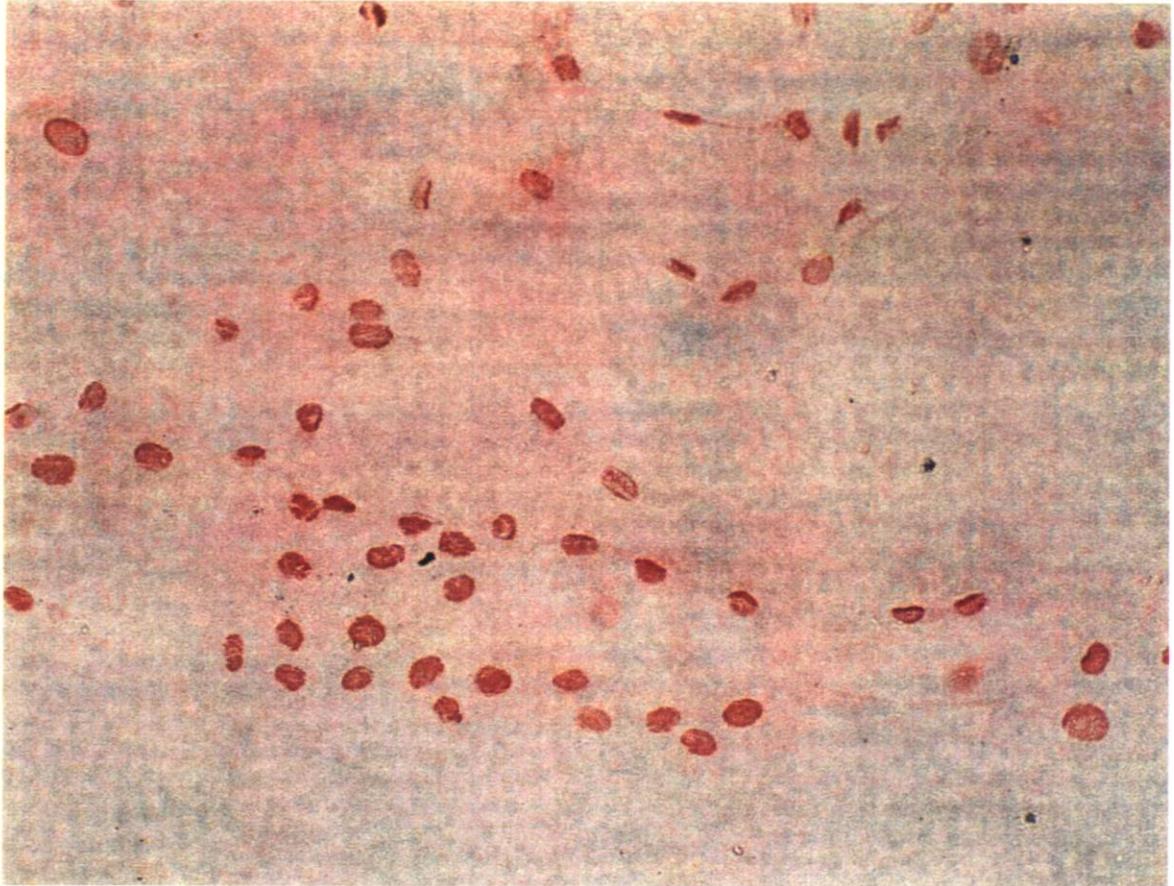


Figure 3.

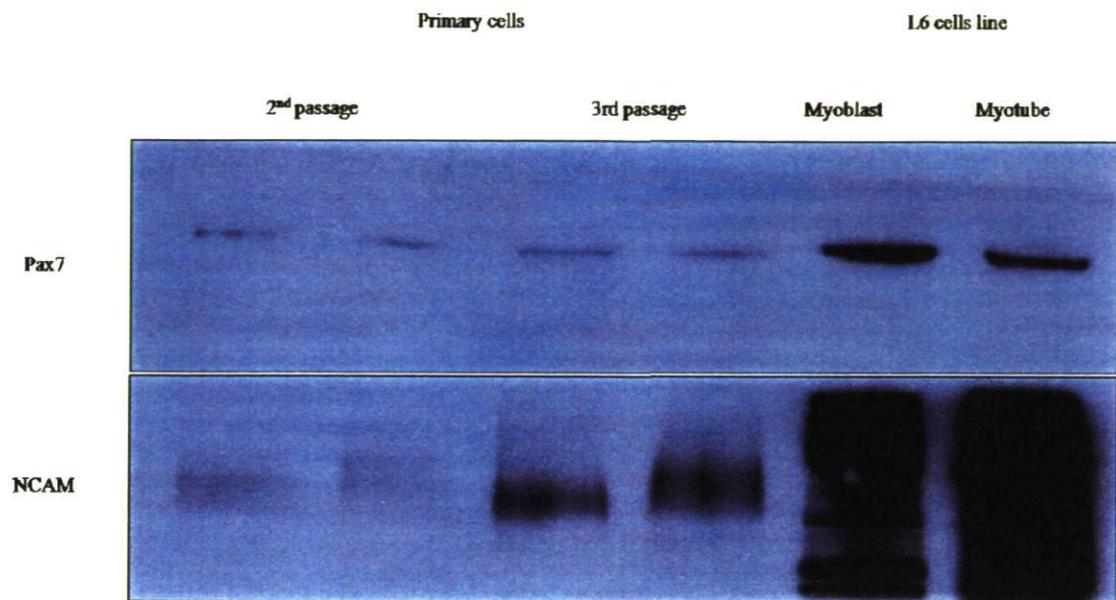


Figure 4.

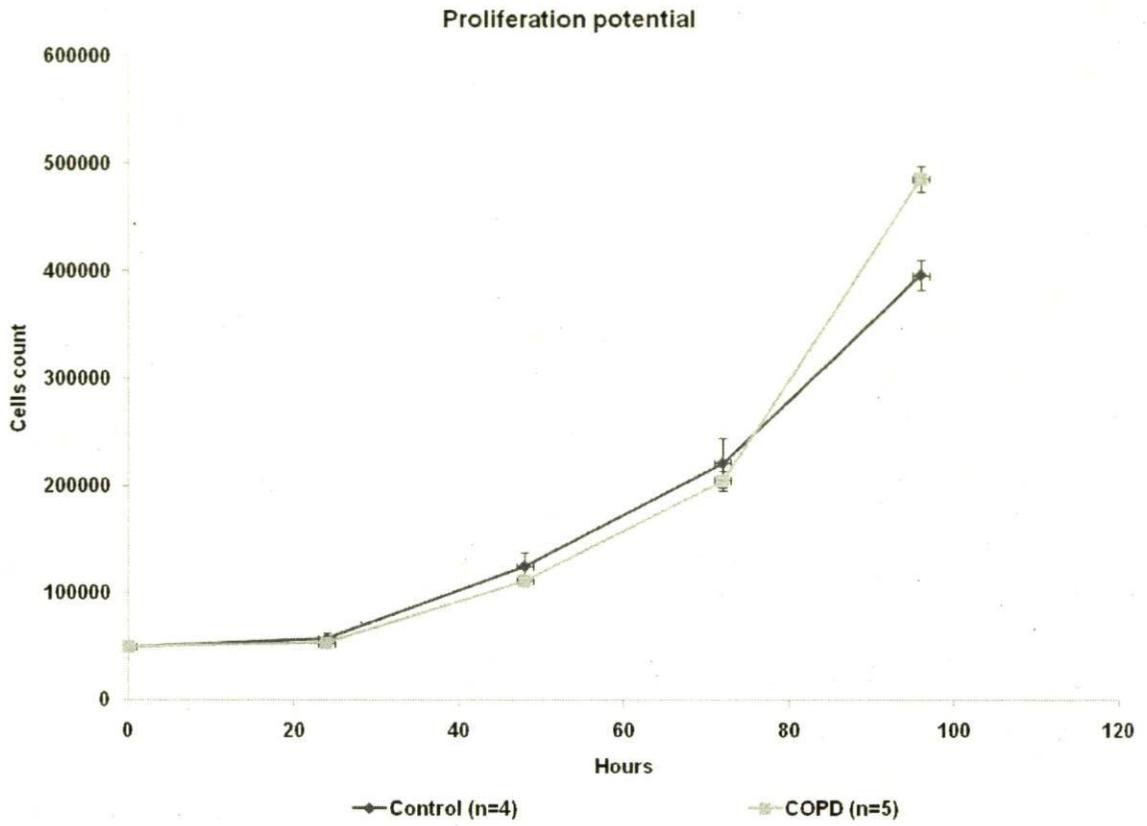


Figure 5.A

Figure 5.1

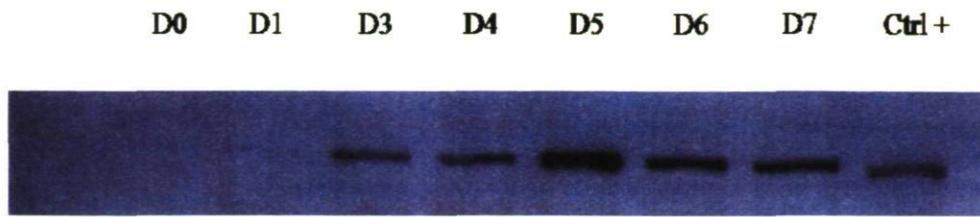


Figure 5.2

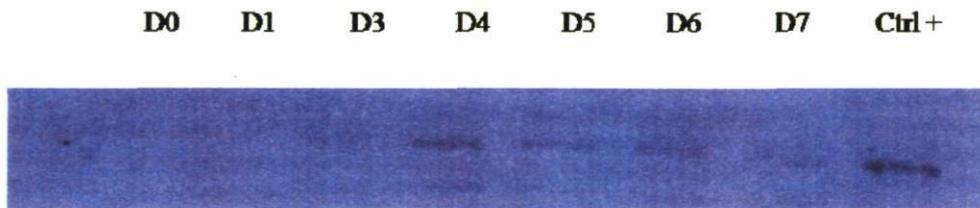
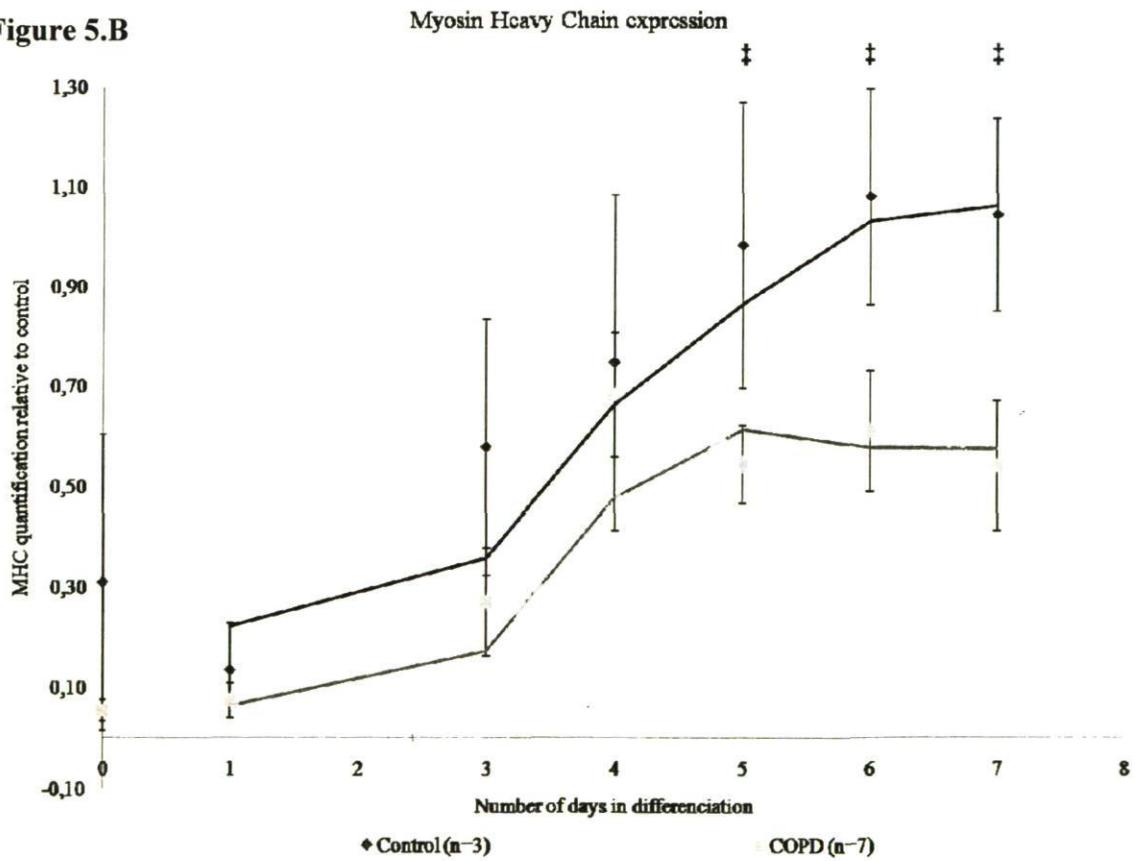


Figure 5.B



Chapitre 3

CONCLUSIONS

Chapitre trois – Conclusions

L'atrophie musculaire dans la MPOC est une conséquence dramatique ayant d'importantes répercussions sur la qualité de vie et la survie des gens atteints. Les causes amorçant le lent développement de la maladie et des manifestations systémiques associées font toujours l'objet d'une intense recherche dans le milieu scientifique. Cette recherche est primordiale pour prévenir et espérer la mise au point d'un traitement contre l'atrophie musculaire. Néanmoins, plusieurs questions demeurent sans réponses afin d'identifier de manière univoque les causes responsables du développement des manifestations systémiques. En ce sens, l'étude de la régénération musculaire dans cette atteinte a été citée quelquefois, mais n'a jamais fait l'objet d'étude approfondie. Ce projet de maîtrise avait donc comme objectif la caractérisation des cellules satellites musculaires obtenus chez des sujets atteints d'une MPOC comparativement à celles de sujets contrôles par l'accomplissement des objectifs spécifiques cités dans la prochaine section.

3.1 Sommaire des résultats

Les objectifs spécifiques atteints sont :

- ✓ *Développer un modèle de culture primaire* par la mise au point de ce modèle chez les souris afin de le transposer chez les humains.
 - Le développement du modèle est complété.
- ✓ *Confirmer le phénotype musculaire des cellules isolées* des biopsies en immuno-histochimie à l'aide du marqueur spécifique aux cellules satellites Pax7.
 - Les cellules isolées possèdent un phénotype musculaire.
- ✓ *Évaluer le potentiel de prolifération des cellules satellites isolées* par leur dénombrement en culture sur une période de 96 heures.

- Il y a un délai d'activation des cellules isolées des patients ayant une MPOC.
 - La courbe de prolifération est équivalente.
- ✓ *Évaluer le potentiel de différenciation des cellules satellites* en cultures par la quantification de la chaîne lourde de myosine en immuno-empreinte suite à des extractions protéiques sur une période de 7 jours de différenciation.
- Le potentiel de différenciation est diminué dans les cellules isolées des patients ayant une MPOC.

3.2 Pertinence des résultats

Le développement d'un nouveau modèle d'étude de l'atrophie musculaire dans la MPOC est une avancée majeure dans le domaine. Ce modèle permettra de soumettre et d'étudier ces cellules dans une panoplie de conditions. Ce modèle générera une grande quantité d'information qui n'aurait pas été possible d'obtenir avec une lignée cellulaire. De plus, ces résultats proviendront de cellules ayant été soumises toute leur vie durant aux conditions qui prévalent dans un organisme donné.

Jusqu'à présent, ce modèle de culture primaire a permis de constater un délai dans l'activation des cellules satellites provenant des patients ayant une MPOC relativement aux sujets témoins. En second lieu, nous avons remarqué que le potentiel de prolifération des cellules satellites était similaire entre les deux groupes. Ensuite nous avons établi que le potentiel de différenciation était altéré dans les cellules provenant des sujets ayant une MPOC.

Ces résultats préliminaires ont permis d'appuyer l'hypothèse selon laquelle la régénération musculaire peut être en cause dans le développement de l'atrophie musculaire observée chez certains patients ayant une MPOC. Des études plus approfondies seront cependant nécessaires afin d'augmenter notre compréhension des mécanismes reliant l'atrophie et la régénération musculaire dans la MPOC.

3.2 Perspectives

Ce projet de maîtrise ouvre la porte à une multitude de possibilités de recherche quant à l'étude de la régénération musculaire dans diverses conditions causant une atrophie périphérique. L'étape initiale de ce projet consistait à caractériser les cellules satellites. Cette étape partiellement accomplie, voici des pistes prioritaires à investiguer.

La section traitant de la possible implication des cellules satellites dans le processus d'atrophie musculaire établit les priorités qui doivent être étudiées. En ce sens, évaluer l'épuisement du potentiel de régénération est une priorité étant donné les conditions qui prévalent dans le tissu musculaire favorisant de nombreux cycles de réparation/régénération. De fait, les nombreuses manifestations systémiques de la maladie pourraient détériorer l'intégrité du tissu musculaire engendrant la sénescence répllicative et ultimement l'atrophie musculaire dans la MPOC.

Dans un deuxième temps, regarder l'impact de l'environnement systémique sur les cellules satellites serait intéressant dû à l'inflammation pulmonaire observée dans la MPOC. L'environnement joue un rôle primordial lors de l'activation et la prolifération des cellules satellites. Une quelconque modification dans le tissu musculaire causée par la présence d'une maladie ayant des effets extrapulmonaires serait probablement suffisante pour altérer la réponse de ces cellules en réponse aux signaux présents.

Par la suite, étant donné l'âge de nos patients il apparaît judicieux d'examiner s'ils sont susceptibles à un déclin prématuré de la régénération musculaire par l'altération des voies de signalisation reliée à l'activation, la prolifération et la différenciation des cellules satellites. Ces voies sont primordiales à l'activation et la progression des cellules satellites jusqu'à ce qu'elle forme une fibre musculaire. Une baisse d'efficacité d'une de ces voies en réponse à des signaux extracellulaires pourrait contribuer à atténuer la réponse des cellules satellites et altérer la régénération.

Dernièrement, l'apoptose et la susceptibilité à l'apoptose des cellules satellites seraient une piste intéressante à investiguer. L'augmentation de l'apoptose est un phénomène qui pourrait plausiblement être favorisé à cause des conditions prévalentes dans le tissu musculaire. L'inflammation et le stress oxydatif sont deux conditions primaires à l'initiation des signaux apoptotiques. Sachant que ces conditions sont présentes dans le tissu pulmonaire, elles pourraient vraisemblablement s'étendre aux tissus musculaires et favoriser l'apoptose des cellules présentes.

Toutes ces pistes ont déjà été démontrées dans diverses conditions d'atrophie musculaire, mais restent à être démontrées dans cette manifestation systémique reliée à la MPOC.

Références

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.
Ref Type: Report
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.
Ref Type: Report
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. 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.
8. 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.

9. 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.
10. 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.
11. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD). Global Strategy for the Diagnosis, Management and Prevention of COPD. 2008. 6-11-0090.
Ref Type: Report
12. World Health Organization. WHO Report on the Global Tobacco Epidemic, 2008: The MPOWER package. 2008. 6-12-0090.
Ref Type: Report
13. Health Canada. Economic Burden of Illness in Canada, 1998. 2002.
Ref Type: Report
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. Tuder, 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. Devereux, G. 2006. ABC of chronic obstructive pulmonary disease. Definition, epidemiology, and risk factors. *BMJ* 332:1142-1144.
34. 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.
35. 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.
36. 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.
37. 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.
38. Balmes, J. R. 2002. Occupational airways diseases from chronic low-level exposures to irritants. *Clin.Chest Med.* 23:727-35, vi.

39. 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.
40. 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.
41. 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.
42. Saetta, M. 1998. [Mechanisms of bronchial obstruction in COPD and emphysema: from anatomopathology to respiratory function]. *Rev.Mal Respir.* 15 Suppl 2:S17-S19.
43. 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.
44. 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.
45. Tetley, T. D. 2005. Inflammatory cells and chronic obstructive pulmonary disease. *Curr.Drug Targets.Inflamm.Allergy* 4:607-618.

46. 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.
47. Chung, K. F. 2001. Cytokines in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur.Respir.J.Suppl* 34:50s-59s.
48. 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.
49. 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.
50. 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.
51. 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.
52. 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.
53. Bhowmik, A., T. A. Seemungal, R. J. Sapsford, and J. A. Wedzicha. 2000. Relation of sputum inflammatory markers to symptoms and lung function changes in COPD exacerbations. *Thorax* 55:114-120.

54. Janssen, S. P., G. Gayan-Ramirez, B. A. Van den, P. Herijgers, K. Maes, E. Verbeken, and M. Decramer. 2005. Interleukin-6 causes myocardial failure and skeletal muscle atrophy in rats. *Circulation* 111:996-1005.
55. 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.
56. 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.
57. 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.
58. Tetley, T. D. 2002. Macrophages and the pathogenesis of COPD. *Chest* 121:156S-159S.
59. 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.
60. 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.

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. 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.
63. 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.
64. 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.
65. 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.
66. 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.
67. 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.

68. 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.
69. Li, X., R. Shu, G. Filippatos, and B. D. Uhal. 2004. Apoptosis in lung injury and remodeling. *J.Appl.Physiol* 97:1535-1542.
70. Lundborg, M., R. Bouhafs, P. Gerde, P. Ewing, P. Camner, S. E. Dahl n, and C. Jarstrand. 2007. Aggregates of ultrafine particles modulate lipid peroxidation and bacterial killing by alveolar macrophages. *Environmental Research* 104:250-257.
71. 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.
72. 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.
73. 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.
74. Hogg, J. C., F. Chu, S. Utokaparch, R. Woods, W. M. Elliott, L. Buzatu, R. M. Cherniack, R. M. Rogers, F. C. Sciruba, 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.

75. Retamales, I., W. M. Elliott, B. Meshi, H. O. Coxson, P. D. Pare, F. C. Sciurba, 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.
76. Barbera, J. A., V. I. Peinado, and S. Santos. 2003. Pulmonary hypertension in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur.Respir.J.* 21:892-905.
77. 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.
78. Altman, E. E. 2004. Update on COPD. Today's strategies improve quality of life. *Adv.Nurse Pract.* 12:49-54.
79. Barnes, P. J. and B. R. Celli. 2009. Systemic manifestations and comorbidities of COPD. *Eur.Respir.J.* 33:1165-1185.
80. 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.
81. 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.
82. 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.

83. 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.
84. Sevenoaks, M. J. and R. A. Stockley. 2006. Chronic Obstructive Pulmonary Disease, inflammation and co-morbidity--a common inflammatory phenotype? *Respir.Res.* 7:70.
85. McMahon, M., J. Gerich, and R. Rizza. 1988. Effects of glucocorticoids on carbohydrate metabolism. *Diabetes Metab Rev.* 4:17-30.
86. 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.
87. 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.*
88. 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.
89. 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.

90. 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.
91. 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.
92. 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.
93. 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.
94. 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.
95. 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.
96. 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.

97. 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.
98. Coronell, C., M. Orozco-Levi, and J. Gea. 2002. COPD and body weight in a Mediterranean population. *Clin.Nutr.* 21:437-438.
99. 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.
100. 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.
101. 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.
102. 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.
103. 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.

104. 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.
105. Lecker, S. H. and A. L. Goldberg. 2002. Slowing muscle atrophy: putting the brakes on protein breakdown. *J.Physiol* 545:729.
106. Gosker, H. R., B. Kubat, G. Schaart, d. van, V, 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.
107. 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.
108. Conejo, R. and M. Lorenzo. 2001. Insulin signaling leading to proliferation, survival, and membrane ruffling in C2C12 myoblasts. *J.Cell Physiol* 187:96-108.
109. Rotwein, P. and E. M. Wilson. 2009. Distinct actions of Akt1 and Akt2 in skeletal muscle differentiation. *J.Cell Physiol* 219:503-511.
110. Hardt, S. E. and J. Sadoshima. 2002. Glycogen Synthase Kinase-3{beta}: A Novel Regulator of Cardiac Hypertrophy and Development. *Circ Res* 90:1055-1063.
111. 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.

112. 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.
113. 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.
114. 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.
115. Glass, D. J. 2005. Skeletal muscle hypertrophy and atrophy signaling pathways. *Int.J.Biochem.Cell Biol* 37:1974-1984.
116. 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.
117. 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.
118. Rommel, C., S. C. Bodine, B. A. Clarke, R. Rossman, L. Nunez, T. N. Stitt, G. D. Yancopoulos, and D. J. Glass. 2001. Mediation of IGF-1-induced skeletal myotube hypertrophy by PI(3)K/Akt/mTOR and PI(3)K/Akt/GSK3 pathways. *Nat Cell Biol* 3:1009-1013.

119. Datta, S. R., A. Brunet, and M. E. Greenberg. 1999. Cellular survival: a play in three Akts. *Genes Dev.* 13:2905-2927.
120. Murao, K., T. Ohshima, H. Imachi, T. Ishida, W. M. Cao, H. Namihira, M. Sato, N. C. Wong, and J. Takahara. 2000. TNF-alpha stimulation of MCP-1 expression is mediated by the Akt/PKB signal transduction pathway in vascular endothelial cells. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 276:791-796.
121. Flueck, M. 2009. Plasticity of the muscle proteome to exercise at altitude. *High Alt.Med.Biol.* 10:183-193.
122. 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.
123. Kominami, E., I. Kunio, and N. Katunuma. 1987. Activation of the intramyofibrillar autophagic-lysosomal system in muscular dystrophy. *Am.J.Pathol.* 127:461-466.
124. Tansey, W. P. 2004. Death, destruction, and the proteasome. *N.Engl.J Med.* 351:393-394.
125. 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.
126. 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.

127. 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.
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. Goll, D. E., V. F. Thompson, H. Li, W. Wei, and J. Cong. 2003. The calpain system. *Physiol Rev.* 83:731-801.
130. Bartoli, M. and I. Richard. 2005. Calpains in muscle wasting. *Int.J.Biochem.Cell Biol.* 37:2115-2133.
131. 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.
132. Russell, A. P. 2009. The molecular regulation of skeletal muscle mass. *Clin.Exp.Pharmacol.Physiol.*
133. Cooper, C. B. 2009. Airflow obstruction and exercise. *Respir.Med.* 103:325-334.
134. 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.
135. Booth, F. W. 1982. Effect of limb immobilization on skeletal muscle. *J.Appl.Physiol* 52:1113-1118.

136. Mattson, J. P. and D. C. Poole. 1998. Pulmonary emphysema decreases hamster skeletal muscle oxidative enzyme capacity. *J.Appl.Physiol* 85:210-214.
137. 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.
138. 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.
139. 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.
140. 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.
141. Femia, R. A. and R. E. Goyette. 2005. The science of megestrol acetate delivery: potential to improve outcomes in cachexia. *BioDrugs.* 19:179-187.
142. Decramer, M., B. F. De, P. A. Del, and S. Marinari. 2005. Systemic effects of COPD. *Respir.Med.* 99 Suppl B:S3-10.
143. 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.

144. 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.
145. 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.
146. 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.
147. 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.
148. 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.
149. Dogra, C., H. Changotra, N. Wedhas, X. Qin, J. E. Wergedal, and A. Kumar. 2007. TNF-related weak inducer of apoptosis (TWEAK) is a potent skeletal muscle-wasting cytokine. *FASEB J.* 21:1857-1869.
150. Kandarian, S. C. and R. W. Jackman. 2006. Intracellular signaling during skeletal muscle atrophy. *Muscle Nerve* 33:155-165.
151. 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.

152. 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.
153. 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.
154. 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.
155. 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.
156. 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 (IL1 beta). *Hum.Mol.Genet.* 1:450.
157. 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.*
158. Allen, D. L., R. R. Roy, and V. R. Edgerton. 1999. Myonuclear domains in muscle adaptation and disease. *Muscle Nerve* 22:1350-1360.

159. 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.
160. 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.
161. 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.
162. 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.
163. Lamberts, S. W., A. W. van den Beld, and A. J. van der Lely. 1997. The endocrinology of aging. *Science* 278:419-424.
164. 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.
165. Casaburi, R. 1998. Rationale for anabolic therapy to facilitate rehabilitation in chronic obstructive pulmonary disease. *Baillieres Clin.Endocrinol.Metab* 12:407-418.
166. 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.
167. 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.
168. Lamberts, S. W., A. W. van den Beld, and A. J. van der Lely. 1997. The endocrinology of aging. *Science* 278:419-424.
169. 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.
170. 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.
171. 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.
172. Nierman, D. M. and J. I. Mechanick. 1999. Hypotestosteronemia in chronically critically ill men. *Crit Care Med.* 27:2418-2421.
173. 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.

174. 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.
175. 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.
176. 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.
177. 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.
178. 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.
179. 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.
180. 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.
181. Charge, S. B. and M. A. Rudnicki. 2004. Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiol Rev.* 84:209-238.

182. Partridge, T. A. 2002. Cells that participate in regeneration of skeletal muscle. *Gene Ther.* 9:752-753.
183. Schultz, E., M. C. Gibson, and T. Champion. 1978. Satellite cells are mitotically quiescent in mature mouse muscle: an EM and radioautographic study. *J.Exp.Zool.* 206:451-456.
184. 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.
185. Hawke, T. J. and D. J. Garry. 2001. Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology. *J.Appl.Physiol* 91:534-551.
186. Charge, S. B. and M. A. Rudnicki. 2004. Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiol Rev.* 84:209-238.
187. Hawke, T. J. and D. J. Garry. 2001. Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology. *J.Appl.Physiol* 91:534-551.
188. Alan J.McComas, Brian R.MacIntosh, and Phil Gardiner. 2006. Skeletal muscle ; Form and Function, 2nd Edition ed.
189. 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.
190. Mauro, A. 1961. Satellite cell of skeletal muscle fibers. *J.Cell Biol.* 9:493-495.
191. Schultz, E. and K. M. McCormick. 1994. Skeletal muscle satellite cells. *Rev.Physiol Biochem.Pharmacol.* 123:213-257.

192. Mauro, A. 1961. Satellite cell of skeletal muscle fibers. *J.Cell Biol.* 9:493-495.
193. 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.
194. Chou, S. M. and I. Nonaka. 1977. Satellite cells and muscle regeneration in diseased human skeletal muscles. *J.Neurol.Sci.* 34:131-145.
195. 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.
196. Snow, M. H. 1977. The effects of aging on satellite cells in skeletal muscles of mice and rats. *Cell Tissue Res.* 185:399-408.
197. 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.
198. 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.
199. 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.
200. 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.

201. 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.
202. 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.
203. Miller, J. B., L. Schaefer, and J. A. Dominov. 1999. Seeking muscle stem cells. *Curr.Top.Dev.Biol* 43:191-219.
204. 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.
205. 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.
206. 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.
207. 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.
208. 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.

209. Seale, P., A. Asakura, and M. A. Rudnicki. 2001. The potential of muscle stem cells. *Dev.Cell* 1:333-342.
210. 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.
211. 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.
212. 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.
213. 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.
214. 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.
215. 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.

216. 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.
217. 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.
218. Tidball, J. G. 2005. Inflammatory processes in muscle injury and repair. *Am.J.Physiol Regul.Integr.Comp Physiol* 288:R345-R353.
219. Rappolee, D. A. and Z. Werb. 1992. Macrophage-derived growth factors. *Curr.Top.Microbiol.Immunol.* 181:87-140.
220. 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.
221. 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.
222. Tidball, J. G. 1995. Inflammatory cell response to acute muscle injury. *Med.Sci.Sports Exerc.* 27:1022-1032.
223. Tidball, J. G. 1995. Inflammatory cell response to acute muscle injury. *Med.Sci.Sports Exerc.* 27:1022-1032.
224. 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.

225. 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.
226. 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.
227. Darr, K. C. and E. Schultz. 1987. Exercise-induced satellite cell activation in growing and mature skeletal muscle. *J.Appl.Physiol* 63:1816-1821.
228. 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.
229. 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.
230. 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.
231. 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.
232. 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.
233. Charge, S. B. and M. A. Rudnicki. 2004. Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiol Rev.* 84:209-238.

234. 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.
235. Schultz, E., D. L. Jaryszak, and C. R. Valliere. 1985. Response of satellite cells to focal skeletal muscle injury. *Muscle Nerve* 8:217-222.
236. 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.
237. 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.
238. 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.
239. 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.
240. 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.
241. 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.

242. Bischoff, R. 1997. Chemotaxis of skeletal muscle satellite cells. *Dev.Dyn.* 208:505-515.
243. 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.
244. 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.
245. 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.
246. 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.
247. 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.
248. Engert, J. C., E. B. Berglund, and N. Rosenthal. 1996. Proliferation precedes differentiation in IGF-I-stimulated myogenesis. *J.Cell Biol.* 135:431-440.
249. 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.

250. 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.
251. 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.
252. 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.
253. 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.
254. 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.
255. 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 Ca²⁺-dependent calcineurin signalling pathway. *Nature* 400:576-581.
256. 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.
257. Greene, E. A. and R. E. Allen. 1991. Growth factor regulation of bovine satellite cell growth in vitro. *J.Anim Sci.* 69:146-152.
258. 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.
259. 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.
260. 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.
261. 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.
262. Floss, T., H. H. Arnold, and T. Braun. 1997. A role for FGF-6 in skeletal muscle regeneration. *Genes Dev.* 11:2040-2051.
263. 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.

264. Whitman, M. 1998. Smads and early developmental signaling by the TGFbeta superfamily. *Genes Dev.* 12:2445-2462.
265. Whitman, M. 1998. Smads and early developmental signaling by the TGFbeta superfamily. *Genes Dev.* 12:2445-2462.
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. 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.
268. 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.
269. 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.
270. 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.
271. 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.

272. 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.
273. 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.
274. 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.
275. Hawke, T. J. and D. J. Garry. 2001. Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology. *J.Appl.Physiol* 91:534-551.
276. 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.
277. 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.
278. Hawke, T. J. and D. J. Garry. 2001. Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology. *J.Appl.Physiol* 91:534-551.
279. 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.
280. Buckingham, M. E. 1994. Muscle: the regulation of myogenesis. *Curr.Opin.Genet.Dev.* 4:745-751.

281. Buckingham, M. E. 1994. Muscle: the regulation of myogenesis. *Curr.Opin.Genet.Dev.* 4:745-751.
282. Vasyutina, E., D. C. Lenhard, and C. Birchmeier. 2007. Notch function in myogenesis. *Cell Cycle* 6:1451-1454.
283. Buas, M. F., S. Kabak, and T. Kadesch. 2009. Inhibition of myogenesis by Notch: evidence for multiple pathways. *J.Cell Physiol* 218:84-93.
284. Le, G. F. and M. Rudnicki. 2007. Satellite and stem cells in muscle growth and repair. *Development* 134:3953-3957.
285. 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.
286. Seale, P., A. Poleskaya, and M. A. Rudnicki. 2003. Adult stem cell specification by Wnt signaling in muscle regeneration. *Cell Cycle* 2:418-419.
287. Mansouri, A., G. Goudreau, and P. Gruss. 1999. Pax genes and their role in organogenesis. *Cancer Res* 59:1707s-1709s.
288. 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.
289. 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.

290. 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.
291. 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.
292. 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.
293. 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.
294. 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.
295. 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.
296. 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.
297. 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.

298. 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.
299. 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.
300. 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.
301. Kaul, A., M. Koster, H. Neuhaus, and T. Braun. 2000. Myf-5 revisited: loss of early myotome formation does not lead to a rib phenotype in homozygous Myf-5 mutant mice. *Cell* 102:17-19.
302. Kablar, B. and M. A. Rudnicki. 2000. Skeletal muscle development in the mouse embryo. *Histol. Histopathol.* 15:649-656.
303. Schultz, E. 1996. Satellite cell proliferative compartments in growing skeletal muscles. *Dev. Biol.* 175:84-94.
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. 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.

306. Yoshida, N., S. Yoshida, K. Koishi, K. Masuda, and Y. Nabeshima. 1998. Cell heterogeneity upon myogenic differentiation: down-regulation of MyoD and Myf-5 generates 'reserve cells'. *J.Cell Sci.* 111 (Pt 6):769-779.
307. 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.
308. 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.
309. 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.
310. 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.
311. Zhou, Z. and A. Bornemann. 2001. MRF4 protein expression in regenerating rat muscle. *J.Muscle Res.Cell Motil.* 22:311-316.
312. 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.
313. 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.

314. 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.
315. 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.
316. 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.
317. 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.
318. 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.
319. Degens, H. 2007. Age-related skeletal muscle dysfunction: causes and mechanisms. *J.Musculoskelet.Neuronal.Interact.* 7:246-252.
320. Amack, J. D. and M. S. Mahadevan. 2004. Myogenic defects in myotonic dystrophy. *Dev.Biol.* 265:294-301.
321. Oexle, K. and A. Kohlschutter. 2001. Cause of progression in Duchenne muscular dystrophy: impaired differentiation more probable than replicative aging. *Neuropediatrics* 32:123-129.
322. 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.
323. 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.
324. 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.
325. 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.
326. 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.
327. 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.
328. 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.
329. 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.

330. 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.
331. 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.
332. Conboy, I. M. and T. A. Rando. 2005. Aging, stem cells and tissue regeneration: lessons from muscle. *Cell Cycle* 4:407-410.
333. 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.
334. 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.
335. 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.
336. 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.
337. 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.

338. 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.
339. Jejurikar, S. S., E. A. Henkelman, P. S. Cederna, C. L. Marcelo, M. G. Urbanchek, and W. M. Kuzon, Jr. 2006. Aging increases the susceptibility of skeletal muscle derived satellite cells to apoptosis. *Exp.Gerontol.* 41:828-836.
340. 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.
341. Jejurikar, S. S., E. A. Henkelman, P. S. Cederna, C. L. Marcelo, M. G. Urbanchek, and W. M. Kuzon, Jr. 2006. Aging increases the susceptibility of skeletal muscle derived satellite cells to apoptosis. *Exp.Gerontol.* 41:828-836.
342. 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.
343. Allen, D. L., R. R. Roy, and V. R. Edgerton. 1999. Myonuclear domains in muscle adaptation and disease. *Muscle Nerve* 22:1350-1360.
344. Darr, K. C. and E. Schultz. 1989. Hindlimb suspension suppresses muscle growth and satellite cell proliferation. *J.Appl.Physiol* 67:1827-1834.
345. Alway, S. E. and P. M. Siu. 2008. Nuclear apoptosis contributes to sarcopenia. *Exerc.Sport Sci.Rev.* 36:51-57.

346. Jejurikar, S. S., E. A. Henkelman, P. S. Cederna, C. L. Marcelo, M. G. Urbanchek, and W. M. Kuzon, Jr. 2006. Aging increases the susceptibility of skeletal muscle derived satellite cells to apoptosis. *Exp.Gerontol.* 41:828-836.
347. Bekaert, S., H. Derradji, and S. Baatout. 2004. Telomere biology in mammalian germ cells and during development. *Dev.Biol.* 274:15-30.
348. 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.
349. 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.
350. Campisi, J. 2001. From cells to organisms: can we learn about aging from cells in culture? *Exp.Gerontol.* 36:607-618.
351. 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.
352. 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.
353. 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.
354. Bergstrom, J. 1975. Percutaneous needle biopsy of skeletal muscle in physiological and clinical research. *Scand.J Clin.Lab Invest* 35:609-616.
355. 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.
356. Mitchell, P. O. and G. K. Pavlath. 2004. Skeletal muscle atrophy leads to loss and dysfunction of muscle precursor cells. *Am.J.Physiol Cell Physiol* 287:C1753-C1762.
357. 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.
358. Price, S. R., J. L. Bailey, X. Wang, C. Jurkowitz, 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.
359. Anker, S. D., J. W. Swan, M. Volterrani, T. P. Chua, A. L. Clark, P. A. Poole-Wilson, and A. J. Coats. 1997. The influence of muscle mass, strength, fatigability and blood flow on exercise capacity in cachectic and non-cachectic patients with chronic heart failure. *Eur.Heart J.* 18:259-269.

360. 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.
361. 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.
362. 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.
363. Mauro, A. 1961. Satellite cell of skeletal muscle fibers. *J.Cell Biol.* 9:493-495.
364. Charge, S. B. and M. A. Rudnicki. 2004. Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiol Rev.* 84:209-238.
365. Hyatt, J. P., G. E. McCall, E. M. Kander, H. Zhong, R. R. Roy, and K. A. Huey. 2008. PAX3/7 expression coincides with MyoD during chronic skeletal muscle overload. *Muscle Nerve* 38:861-866.
366. 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.
367. Zammit, P. S., J. P. Golding, Y. Nagata, V. Hudon, T. A. Partridge, and J. R. Beauchamp. 2004. Muscle satellite cells adopt divergent fates: a mechanism for self-renewal? *J.Cell Biol* 166:347-357.

368. Collins, C. A. and T. A. Partridge. 2005. Self-renewal of the adult skeletal muscle satellite cell. *Cell Cycle* 4:1338-1341.
369. 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.
370. Jejurikar, S. S. and W. M. Kuzon, Jr. 2003. Satellite cell depletion in degenerative skeletal muscle. *Apoptosis*. 8:573-578.
371. 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.
372. 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.
373. Allen, D. L., R. R. Roy, and V. R. Edgerton. 1999. Myonuclear domains in muscle adaptation and disease. *Muscle Nerve* 22:1350-1360.
374. Mitchell, P. O. and G. K. Pavlath. 2001. A muscle precursor cell-dependent pathway contributes to muscle growth after atrophy. *Am.J.Physiol Cell Physiol* 281:C1706-C1715.
375. Partridge, T. A. 2002. Cells that participate in regeneration of skeletal muscle. *Gene Ther*. 9:752-753.
376. 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.

377. Knudsen, K. A., S. A. McElwee, and L. Myers. 1990. A role for the neural cell adhesion molecule, NCAM, in myoblast interaction during myogenesis. *Dev.Biol.* 138:159-168.
378. Charge, S. B. and M. A. Rudnicki. 2004. Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiol Rev.* 84:209-238.
379. Hawke, T. J. and D. J. Garry. 2001. Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology. *J.Appl.Physiol* 91:534-551.
380. 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.
381. Alway, S. E. and P. M. Siu. 2008. Nuclear Apoptosis Contributes to Sarcopenia. [Article]. *Exercise & Sport Sciences Reviews* 36:51-57.
382. Barnes, P. J. and B. R. Celli. 2009. Systemic manifestations and comorbidities of COPD. *Eur.Respir.J.* 33:1165-1185.
383. 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.
384. Mitch, W. E. and S. R. Price. 2003. Mechanisms activating proteolysis to cause muscle atrophy in catabolic conditions. *J.Ren Nutr.* 13:149-152.
385. 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.

386. 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.
387. Timchenko, N. A., P. Iakova, Z. J. Cai, J. R. Smith, and L. T. Timchenko. 2001. Molecular basis for impaired muscle differentiation in myotonic dystrophy. *Mol. Cell Biol.* 21:6927-6938.
388. Oexle, K. and A. Kohlschutter. 2001. Cause of progression in Duchenne muscular dystrophy: impaired differentiation more probable than replicative aging. *Neuropediatrics* 32:123-129.
389. Webster, C. and H. M. Blau. 1990. Accelerated age-related decline in replicative life-span of Duchenne muscular dystrophy myoblasts: implications for cell and gene therapy. *Somat. Cell Mol. Genet.* 16:557-565.
390. Oexle, K. and A. Kohlschutter. 2001. Cause of progression in Duchenne muscular dystrophy: impaired differentiation more probable than replicative aging. *Neuropediatrics* 32:123-129.
391. Brack, A. S. and T. A. Rando. 2007. Intrinsic changes and extrinsic influences of myogenic stem cell function during aging. *Stem Cell Rev.* 3:226-237.