

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

IMPACT DE LA SUREXPRESSION DE PARKIN DANS LE MUSCLE SQUELETTIQUE
DE SOURIS JEUNES ET ÂGÉES

MÉMOIRE

PRÉSENTÉ

COMME EXIGENCE PARTIELLE

DE LA MAÎTRISE EN KINANTHROPOLOGIE

PAR

OLIVIER REYNAUD

JANVIER 2018

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.10-2015). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

REMERCIEMENTS

En premier lieu, je tiens à remercier les membres de mon jury les Drs. José Morais (Mc Gill), Anthony Karelis (UQAM) et Marc Bélanger (UQAM) qui ont accepté d'évaluer mon manuscrit de mémoire et pour les précieux conseils qu'ils m'ont fourni lors de ma présentation d'avant-projet.

Je voudrais également remercier mon directeur de recherche, le Dr. Gilles Gouspillou, pour sa patience et sa très grande compréhension. Je ne pense pas que j'aurais pu passer à travers toutes les embûches rencontrées au cours de ces quelques années sans son aide précieuse.

Je tiens également à remercier la Dre Mylène Aubertin-Leheudre, qui a bien voulu me donner ma chance en me prenant sous son aile au début de ma maîtrise. Un grand merci également à Charlotte Pion et Sébastien Barbat qui ont dû supporter mes gaffes, mais qui m'ont surtout encouragé dès le premier jour. Un énorme merci à l'ensemble de mes collègues étudiants et à l'équipe du département. Je ne saurais tous les nommer et je m'excuse d'avance d'en omettre quelques-uns; Carole Roy (technicienne de laboratoire, UQAM), Robin Drolet (technicien en électronique, UQAM), Sarah Bogard, Julie Faitg, Félix St-Jean de Pelletier, Feras Alkaterji.

Une pensée particulière à Jean-Philippe Leduc-Gaudet, mon doctorant préféré. Merci d'avoir écouté mes coups de gueule et de m'avoir toujours soutenu, même dans les moments les plus difficiles.

En dernier lieu, je voudrais remercier, Patrick de Bortoli pour tout ce qu'il a fait, Myrna Khuon qui m'a poussé à reprendre mes études, et mes parents, pour leur soutien inébranlable. Malgré la distance, vous avez toujours été derrière moi.

Et comment oublier Kylian, qui bien que trop petit pour s'en rendre compte, aura été ma vraie source de motivation. Voir son sourire m'aura redonné le moral à chaque fois que j'ai voulu abandonner.

Merci à tous.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	ii
TABLE DES MATIÈRES	iv
LISTE DES FIGURES	vii
LISTE DES TABLEAUX	ix
LISTE DES ABRÉVIATIONS	x
RÉSUMÉ.....	xiv
CHAPITRE I INTRODUCTION	1
1.1 Généralités sur le vieillissement	1
1.2 Généralités sur le vieillissement musculaire.....	2
1.3 Le vieillissement musculaire : un processus multifactoriel	3
1.4 Fonctions mitochondriales et vieillissement musculaire.....	7
1.4.1 Généralités sur les mitochondries	7
1.4.2 Le fonctionnement des mitochondries	8
1.4.3 Énergétique mitochondriale et vieillissement musculaire	16
1.4.4 Production de radicaux libres mitochondriaux et vieillissement musculaire.....	17
1.4.5 Capacité mitochondriale de rétention en calcium, apoptose et vieillissement.....	18
1.5 Mitophagie et vieillissement musculaire	20
1.5.1 Généralités sur la mitophagie	20
1.5.2 Mitophagie : fonctionnement et régulation	25
1.5.3 Parkin.....	26

1.5.4	Relations entre PINK1 et Parkin	28
1.5.5	Mitophagie et vieillissement musculaire : un mécanisme hypothétique 30	
1.6	Objectifs et hypothèses	31
CHAPITRE II MÉTHODES		33
2.1	Animaux	33
2.2	Transduction et prélèvement des tissus	34
2.3	Analyses histologiques et immunohistochimiques.....	35
2.3.1	Analyse du phénotype musculaire (taille et proportion des différents types de fibres).....	35
2.3.2	Immunomarquage pour PGC1- α et 4-Hydroxynonenal (4HNE)	36
2.3.3	Détermination <i>in situ</i> de l'activité de la Succinate DéHydrogénase (SDH) 37	
2.3.4	Détection de l'apoptose par marquage TUNEL	38
2.4	Immunobuvardage.....	40
2.5	Microscopie électronique	41
2.6	Analyses statistiques	42
CHAPITRE III RÉSULTATS.....		44
3.1	Caractéristiques des animaux	44
3.2	Surexpression de Parkin	45
3.3	Effet de la surexpression de Parkin sur le poids des muscles TA et GAS....	46
3.4	Effets du vieillissement et de la surexpression de Parkin sur la surface de section des fibres musculaires	48
3.5	Effets du vieillissement et de la surexpression de Parkin sur un marqueur de la synthèse protéique.....	51
3.6	Effet de la surexpression de Parkin sur l'activité d'enzymes mitochondriales et sur le contenu en mitochondries.....	51
3.7	Effet de la surexpression de Parkin sur la biogenèse et la dynamique mitochondriale.....	55

3.8	Effet de la surexpression de Parkin sur l'autophagie.....	59
3.9	Effet de la surexpression de Parkin sur l'apoptose.....	60
3.10	Effet de la surexpression de Parkin sur le stress oxydant.....	62
CHAPITRE IV DISCUSSION.....		64
CHAPITRE V CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....		72
RÉFÉRENCES		75

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1 : Projection de l'évolution du pourcentage de la population âgée canadienne de 2015 à 2030	1
Figure 1.3 : La sarcopénie : un processus multifactoriel	6
Figure 1.4.1 : Schéma d'une mitochondrie	8
Figure 1.4.2.1 : Phosphorylation oxydative mitochondriale.....	9
Figure 1.4.2.4.1 : Fusion et fission mitochondriale.....	14
Figure 1.4.2.4.2 : Dynamique, biogénèse et mitophagie	15
Figure 1.5.1: Les deux systèmes de conjugaison Atg8 et Atg12 de la levure	25
Figure 1.5.3 : Structure de Parkin.	27
Figure 1.5.4 : Relations entre PINK1 et Parkin	29
Figure 2.2 : VAA Parkin.....	34
Figure 3.1 : Évolution du poids à 3, 5 et 7 mois pour les souris jeunes et à 18, 20 et 22 mois pour les souris âgées	44
Figure 3.2 : L'inoculation du VAA Parkin provoque une augmentation du contenu en Parkin dans les muscles TA de souris jeunes et âgées.....	45
Figure 3.3.1 : Effet du vieillissement et de la surexpression de Parkin sur le poids des muscles Tibialis anterior et Gastrocnemius (analyse contrôle montrant que la masse n'est pas altérée par la GFP)	47
Figure 3.3.2 : Comparaison du poids des muscles TA des souris jeunes et âgées proportionnellement aux poids des muscles TA-GFP des souris jeunes	47
Figure 3.4.1 : Effet de la surexpression de Parkin sur la taille des fibres musculaires dans le GAS de souris jeunes et âgées	49
Figure 3.4.2 : Effet de la surexpression de Parkin sur la taille et le type de fibres musculaires dans le TA de souris jeunes et âgées	50
Figure 3.5 : Effet de la surexpression de Parkin sur le contenu en S6 dans le TA de souris jeunes et âgées	51

Figure 3.6.1 : Effet de la surexpression de Parkin sur le contenu de sous-unités représentatives des différents complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale dans le muscle de souris jeunes et âgées	53
Figure 3.6.2 : La surexpression de Parkin augmente l'activité de la SDH dans le TA des souris jeunes et âgées.	54
Figure 3.6.3 : Effet de la surexpression de Parkin sur la densité et la surface de coupe mitochondriales dans le muscle squelettique de souris âgées.	55
Figure 3.7.1 : Effet de la surexpression de parkin sur la biogenèse mitochondriale dans le muscle de souris jeunes et âgées	57
Figure 3.7.2 : Effet de la surexpression de Parkin sur la dynamique mitochondriale dans le muscle de souris jeunes et âgées	58
Figure 3.8 : Effet de la surexpression sur la mitophagie dans le muscle squelettique de souris jeunes et âgées lors de la surexpression de Parkin	59
Figure 3.9 : La surexpression de Parkin atténue l'augmentation de l'apoptose observée au cours du vieillissement musculaire.	61
Figure 3.10 : Le stress oxydant est diminué, lors du vieillissement, par la surexpression de Parkin dans le muscle squelettique	63

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 2.3.4: Protocole de fabrication du mélange de réaction TdT 39

LISTE DES ABRÉVIATIONS

A.

- ADN : Acide DéoxyriboNucléique
- ADNm : ADN mitochondrial
- ADP : Adénosine Di-Phosphate
- AIF : facteur d'induction apoptotique
- Akt : Protéine Kinase
- ANT : Adénine Nucléotide Translocase
- APAf-1 : l'Apoptotic Protease Activating Factor-1
- ATG : Autophagy-related Genes
- ATP : Adénosine Tri-Phosphate

•

B.

- Bcl2L13 : B-cell lymphoma 2 Like 13
- Bnip3 : BCL2/adenovirus E1B 19 kDa protein-interacting protein 3
- BrdU : Bromolated deoxyUridine
- Br-dUTP : Bromolated DeoxyUridine Triphosphate Nucleotides

C.

- Ca²⁺ : calcium
- CoQ : Co-enzyme Q
- Cyt_c : Cytochrome c

D.

- $\Delta\mu_{H^+}$: gradient électro-chimique de protons
- DHEA : DéHydroÉpiAndrostérone
- DRP : Dynamin-Related Protein
- Drp1 : Dynamin related protein 1
- dUTP : déoxy Uracile Tri-Phosphate

E.

- e⁻ : électrons
- EDTA : Éthylène Diamine Tétra-Acétique
- EndoG : endonucléase G

F.

- FADH₂ : Flavine adénine dinucléotide réduit
- Fis1 : Fission 1
- FMN : Flavine Mono-Nucléotide
- FoxO3 : Forkhead box O3
- FUNDC1 : FUN14 domain containing

- G.
- GAS : Gastronecmius
 - GFP : Green Fluorescent Protein
 - GH : hormone de croissance
- H.
- 4-HNE : 4-Hydroxynonenal
 - H⁺ : protons
 - HECT : Homologous to the E6-AP Carboxyl Terminus
 - HRP : Horse Radish Peroxydase
- I.
- IGF-1 : le facteur de croissance semblable à l'insuline-1
- L.
- LC3 : Microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3B
- M.
- MCK : Muscle Creatine Kinase
 - MET : Microscopie Électronique à Transmission
 - Mfn : Mitofusin
 - MHC : Myosin Heavy Chain
 - MitoQ : mitochondria-targeted antioxydant Q
 - mTOR : mamalian Target Of Rapamicin
 - mTORC1 : mamalian Target Of Rapamicin Complex 1
- N.
- NADH : Nicotinamide Adénine Di-nucléotide réduit
 - NAD⁺ : Nicotinamide Adénine Di-nucléotide oxydé
 - NBR1 : Neighbor of BRCA1 gene 1 protein
 - NIX : Gène pro-apoptotique
 - NRF : Nuclear respiratory factor
- O.
- O₂^{•-} : anion superoxyde
 - OPA1 : OPTic Atrophy 1
 - OXPHOS : Oxydative Phosphorylation
- P.
- p62/SQSTM1 : ubiquitin-binding protein p62
 - PBS : Phosphate-Buffered Saline
 - PDH : Pyruvate DésHydrogénase
 - PE : Phosphatidyl-Éthanolamine
 - PGC1- α : Peroxisome proliferator-activated receptor Gamma Coactivator 1-alpha

- Pi : Phosphate inorganique
 - PINK1 : PTEN-Induced Putative Kinase 1
 - PtdIns : Phosphatidylinositol
 - PTP : pore de transition de perméabilité
 - PVDF : *PolyVinylidene Fluoride*
- R.
- RBR : RING-Between-RING
 - RE : Réticulum Endoplasmique
 - REP : Repressor Element of Parkin
 - RING : Really Interesting New Gene
 - RLDO : Radicaux Libres Dérivés de l'Oxygène
 - RQRV : Réseau Québécois de Recherche sur le Vieillessement
- S.
- S6K : Ribosomal protein S6 kinase
 - SDH : Succinate DéHydrogénase
 - SdS : Surface de Section
 - SDS-PAGE : Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis
 - Ser : Sérine
 - SS-31 : Elamipretide
- T.
- TA : Tibialis Anterior
 - TBS-T : Tris-Buffered Saline + 0,1% Tween 20
 - TdT : Terminal deoxynucleotidyl Transferase
 - TFAM : mitochondrial Transcription Factor A
 - Thr : Thréonine
 - TNF- α : Tumor Necrosis Factor- α
 - TOM : Mitochondrial import receptor subunit
 - TOR : Target Of Rapamicin
 - TORC1 : Target Of Rapamicin Complex 1
 - TUNEL : Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) dUTP Nick-End Labeling
- U.
- Ubl : Ubiquitine-like
 - UCP : protéines découplantes
 - ULK : Serine/threonine-protein kinase
 - UQ $^{\bullet-}$: radical semiquinone
 - UQAM : Université du Québec À Montréal
- V.
- VAA : Virus Adéno-Associés
 - VDAC : canal à anions dépendant du voltage

- Vps : Class III PI 3-kinase

RÉSUMÉ

Un des changements majeurs associé au vieillissement représente la perte progressive de masse et de force musculaire, un processus biologique nommé sarcopénie. Grâce aux nombreuses données accumulées au fil des années, il semble que dans le muscle âgé, l'accumulation de dysfonctions mitochondriales serait à l'origine de ce processus. De récentes études suggèrent que la mitophagie, le procédé chargé d'éliminer les mitochondries dysfonctionnelles ou endommagées, serait altérée dans le muscle squelettique vieillissant. Une mitophagie déficiente serait en effet, un processus à l'origine de l'accumulation des dysfonctions mitochondriales et donc de l'établissement de la sarcopénie. Afin de tester cette hypothèse, nous avons cherché à connaître l'impact de la surexpression de Parkin dans le muscle squelettique de souris jeunes et âgées. Parkin fût surexprimé pendant quatre mois dans le *tibialis anterior* (TA) et le *gastrocnemius* (GAS) de souris jeunes (âgées de trois mois à la première injection et de sept mois lors du sacrifice) et de souris âgées (âgées de 18 mois à la première injection et 22 mois lors du sacrifice) par injection intramusculaire de Virus Adéno-Associés (VAA). Notre virus contenait un promoteur muscle spécifique MCK (Muscle Creatine Kinase) ainsi qu'une séquence codant pour la protéine Green Fluorescent Protein (GFP). Un virus contrôle ne contenant que la GFP fût injecté aux pattes opposées. Comme nos hypothèses le suggéraient, les muscles âgés n'exprimant que la GFP (contrôles) montraient une baisse de poids et de la surface de section des fibres comparativement aux muscles contrôles jeunes. Dans les deux phénotypes, jeunes et vieux, la surexpression de Parkin entraînait une augmentation du poids, de la surface de section des fibres et de l'activité du complexe II de la chaîne respiratoire. Chez les souris âgées, la surexpression de Parkin entraîna une augmentation du contenu en complexe II et IV ainsi que de PGC1- α . De plus, la surexpression de Parkin entraînait également une augmentation de la densité mitochondriale. Les muscles exprimant uniquement la GFP des souris âgées montraient une augmentation du contenu en 4-Hydroxynonanal (4-HNE), un marqueur du stress oxydatif, comparativement aux muscles homologues jeunes. Il est également intéressant de noter, que dans le cas des souris âgées, les muscles sur-exprimant Parkin montraient une diminution du contenu en 4-HNE comparativement à leurs contrôles.

En conclusion, nos résultats montrent que la surexpression de Parkin atténue la sarcopénie dans le muscle âgé, et augmente la genèse et la densité mitochondriales, en plus diminuer le stress oxydant. Dans le muscle jeune, la surexpression de Parkin a étonnamment déclenchée une hypertrophie. Au vue de nos résultats, la

surexpression de Parkin pourrait être envisagée dans la lutte contre la sarcopénie et les pertes de fonction musculaire chez les jeunes adultes.

Mots clés : Vieillesse, Sarcopénie, Mitochondrie, Parkin, Mitophagie.

CHAPITRE I

INTRODUCTION

1.1 Généralités sur le vieillissement

Le nombre de personnes âgées augmente à l'échelle mondiale d'année en année. La population canadienne suit elle aussi cette tendance. En 2012, le nombre de personnes âgées canadiennes de 65 ans et plus était estimé à 5 186 800 soit 14,9% de la population totale (Bohnert *et al.*, 2015), ce qui représente une augmentation de 5,2% sur les 3 dernières décennies (Bohnert *et al.*, 2015). La population des aînés ayant plus que doublé sur cette période, il faut s'attendre à ce qu'elle représente près d'un quart des Canadiens vers la décennie 2030 (Bohnert *et al.*, 2015) (Fig. 1.1).

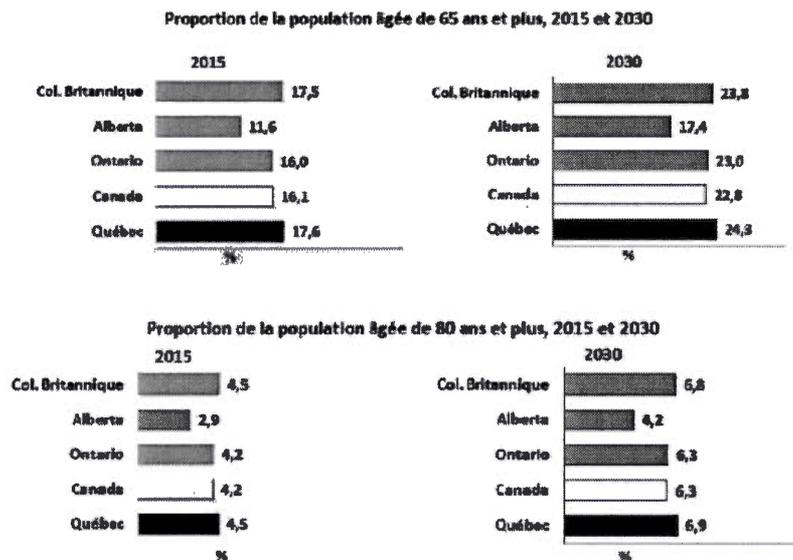


Figure 1.1 : Projection de l'évolution du pourcentage de la population âgée canadienne de 2015 à 2030

Légende : Histogrammes représentant une projection, sur 15 ans, de l'évolution du pourcentage de la population canadienne, des 5 provinces principales, âgée de plus de 65 et 80 ans. Tiré du site internet (<http://comparaisons-sante->

quebec.ca/vieillissement-de-la-population-et-fecondite-comparaisons-canadiennes/).

Au cours du vieillissement, on assiste à d'importants changements de la composition corporelle. En effet, on assiste à une augmentation progressive de la masse grasse associée à une diminution progressive de la masse maigre (Ferry, 2002). La masse maigre est définie comme étant la masse totale des organes (foie, reins, cœur etc.) et des muscles. Il est important ici de souligner que la perte de masse maigre n'affecte que les muscles (Ferry, 2002). En effet, alors que le muscle représente 45% du poids total chez le jeune, il ne représente plus que 25% du poids corporel chez les aînés (Arcand *et al.*, 2007).

1.2 Généralités sur le vieillissement musculaire

Le vieillissement musculaire s'accompagne d'une baisse du volume et de la masse du muscle squelettique. Dès 50 ans, on assiste à une perte de masse musculaire annuelle approximative d'un à deux pourcents (Janssen *et al.*, 2002), une perte qui s'intensifie après l'âge de 65-70 ans. Cette perte est causée par une diminution de la taille (Forbes *et al.*, 1970) et du nombre de fibres musculaires (Lexell *et al.*, 1988). De nombreuses études rapportent également un déclin conséquent de la force (Balagopal *et al.*, 1997, Fiatarone *et al.*, 1990, Frontera *et al.*, 1991, Lindle *et al.*, 1997), ainsi qu'une diminution de la qualité de contraction (Fukagawa *et al.*, 1995a, Fukagawa *et al.*, 1995b) dans les muscles squelettiques âgés.

Le processus de vieillissement musculaire, qui est associé à des pertes de masse, de force et de qualité musculaires, est nommé sarcopénie (du grec *sarcx*, chair et *penia*, perte) (Rosenberg, 1997). La sarcopénie a de multiples conséquences négatives. En effet, la sarcopénie entraîne un déclin des capacités fonctionnelles (Bassey *et al.*, 1992, Fiatarone *et al.*, 1990, Fukagawa *et al.*, 1995b), une perte de mobilité, une

augmentation du risque de chutes, et peut mener, si elle est sévère, à la perte d'autonomie et à la dépendance des personnes âgées (Reid *et al.*, 2012). Il est de ce fait évident que la sarcopénie peut avoir une influence extrêmement négative sur la qualité de vie des personnes affectées. La sarcopénie a également des conséquences économiques très importantes. En effet, les coûts de santé associés aux conséquences de la sarcopénie ont été estimés à plus de 18 milliards de dollars pour la seule année 2002 aux États-Unis (Janssen *et al.*, 2004). Si l'on considère l'évolution démographique de notre population détaillée dans la section précédente, il est évident que la sarcopénie va devenir un problème économique et sociétal colossal dans les années à venir.

1.3 Le vieillissement musculaire : un processus multifactoriel

La sarcopénie est un processus physiologique extrêmement complexe. De multiples facteurs et processus peuvent en effet influencer son développement (Fig. 1.3). Par exemple, il a été rapporté que le vieillissement est associé à une diminution du nombre de cellules satellites (cellules impliquées dans la régénération tissulaire), ce qui résulte en une moins bonne capacité de régénération musculaire avec le vieillissement (Delbono, 2011). L'augmentation de l'adiposité avec le vieillissement s'accompagne d'une augmentation de la concentration en cytokines pro-inflammatoires circulantes, dont font parties les interleukines et le TNF- α (Tumor Necrosis Factor). Ces cytokines ont des effets protéolytiques bien caractérisés sur les cellules musculaires et peuvent ainsi contribuer à la sarcopénie (Manini *et al.*, 2011).

Au niveau neurologique, il a été démontré que l'activation centrale est ralentie du fait d'une diminution de la taille des neurones et de la matière blanche, de l'hypoexcitabilité du cortex et d'une dégradation des gaines de myélines entraînant une diminution des performances motrices (Cardasis *et al.*, 1987, Holloszy *et al.*,

1995a, Wokke *et al.*, 1990). La moelle épinière, quant à elle, est également le siège de changements importants, incluant une diminution du nombre de motoneurons de la corne antérieure entraînant une perte de l'excitabilité de la moelle épinière et d'unités motrices au niveau musculaire (Tomlinson *et al.*, 1977). Il a également été démontré qu'à partir de 60 ans, le nombre de motoneurons chute drastiquement (Brown *et al.*, 1988, Tomlinson *et al.*, 1977). Il est indéniable que cette perte joue un rôle important dans la perte de fonction et l'atrophie musculaires.

D'un point de vue structural, de nombreuses études ont montré qu'avec l'âge, il se produit un débalancement du type de fibres dans le muscle strié squelettique (Balagopal *et al.*, 1997, Lexell *et al.*, 1988, Porter *et al.*, 1995). En effet, le rapport fibres de type I sur fibres de types II semblerait augmenter avec l'âge, entraînant ainsi un basculement vers une orientation plus oxydative du muscle. Ceci pourrait contribuer à la perte de puissance constatée chez les personnes âgées, les fibres de type I développant une puissance inférieure par rapport aux fibres de types II (Kim *et al.*, 2013). Dans une étude récente, notre groupe a montré que les fibres de type IIa semble être préférentiellement affectées par le vieillissement. En effet, en comparant des hommes âgés à des hommes jeunes, nous avons obtenus des résultats indiquant que la taille et la proportion des fibres de type IIa dans le muscle vaste latéral étaient inférieures chez les sujets âgés alors qu'aucune différence significative n'a été observée pour les fibres de type I et IIx (St-Jean-Pelletier *et al.*, 2016).

La diminution de la prise alimentaire avec l'avancée en âge est également un facteur à prendre en compte. Il est en effet reconnu que chez l'aîné, la prise alimentaire est diminuée (Holloszy *et al.*, 1995b) notamment à cause d'un réflexe de satiété précoce (John E Morley *et al.*, 1996). Cette diminution de l'apport calorique peut être à l'origine d'un débalancement du turn-over protéique et accélérer la perte musculaire (J. E. Morley *et al.*, 2001). De nombreuses hormones peuvent également jouer un rôle

important dans la sarcopénie, particulièrement la testostérone, la déhydroépiandrostérone (DHEA), l'hormone de croissance (GH), ainsi que le facteur de croissance semblable à l'insuline (IGF-1). La baisse de leurs concentrations plasmiqes survenant au cours du vieillissement contribue très probablement au développement de la sarcopénie (revue dans (Greenlund *et al.*, 2003)).

Enfin, et comme il le sera détaillé par la suite, de solides données expérimentales disponibles dans la littérature indiquent que l'accumulation de mitochondries dysfonctionnelles au sein des cellules musculaires représente un mécanisme causalement impliqué dans le développement de la sarcopénie (Dirks *et al.*, 2006, Gousspillou *et al.*, 2014b, Hepple, 2014).

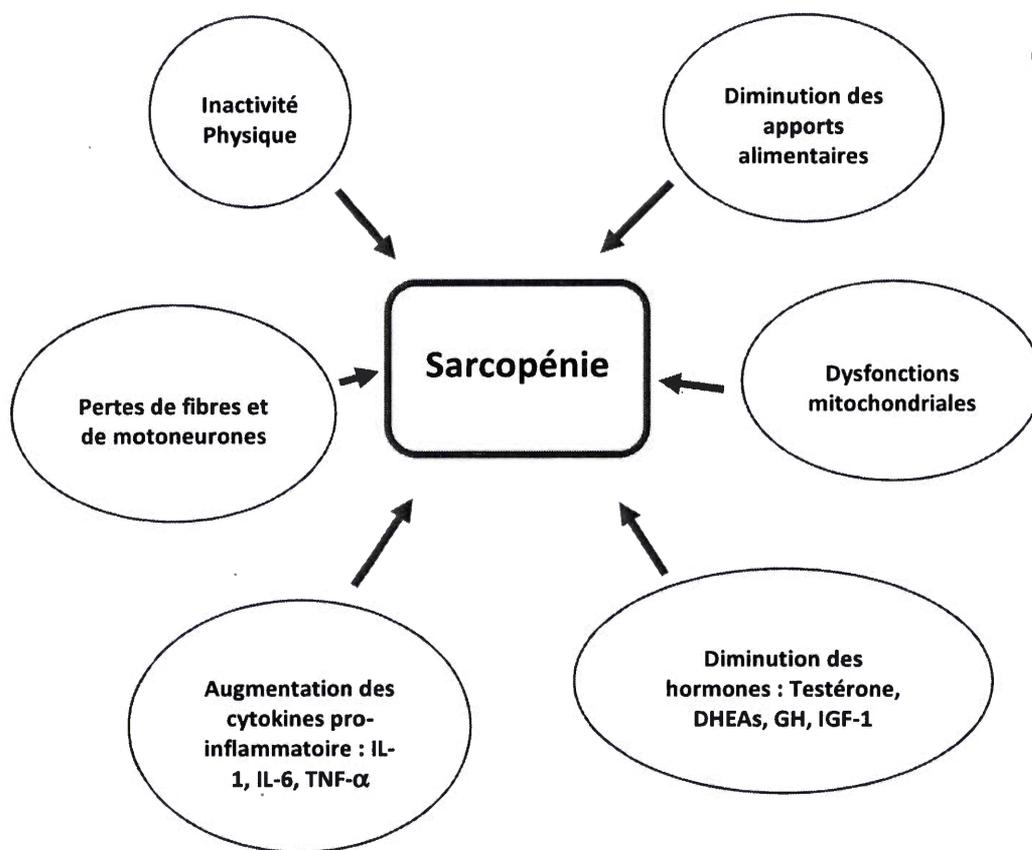


Figure 1.3 : La sarcopénie : un processus multifactoriel

Légende : Schéma représentant les multiples mécanismes contribuant au développement de la sarcopénie. Adapté de l'article (J. E. Morley *et al.*, 2001)

1.4 Fonctions mitochondriales et vieillissement musculaire

1.4.1 Généralités sur les mitochondries

Les mitochondries sont des organites intracellulaires à double membrane qui proviennent de l'insertion, il y a environ deux milliards d'années, d'une protéobactérie par un précurseur de la cellule eucaryote actuelle (revue dans (Friedman *et al.*, 2014)). Ceci a abouti à la formation d'une organelle ayant une membrane interne, délimitant la matrice mitochondriale, et une membrane externe. Ces deux membranes sont séparées par l'espace inter-membranaire (Fig. 1.4.1). Les mitochondries contiennent un génome circulaire, localisé dans la matrice mitochondriale, codant pour 13 protéines, qui sont toutes constitutives des complexes de la phosphorylation oxydative (Friedman *et al.*, 2014). Cette dernière, au travers de l'activité de la chaîne respiratoire, est à l'origine de la création d'un gradient électrochimique de part et d'autre de la membrane interne mitochondriale qui est utilisé par l'ATP synthase pour la formation d'ATP. La chaîne respiratoire, qui représente le site principal de consommation de l'oxygène dans l'organisme, est un lieu important de production des radicaux libres dérivés de l'oxygène (RLDO). Les mitochondries sont également impliquées dans de nombreux autres processus cellulaires tels que la transduction, la thermogénèse, la régulation du stress oxydatif et du cycle cellulaire et l'apoptose. Longtemps considérées, à tort, comme des organelles en forme de petit pois, il est maintenant reconnu que les mitochondries constituent un réseau dynamique, capable de fissionner et de fusionner, et jouant un rôle essentiel dans le fonctionnement normal des cellules (Friedman *et al.*, 2014).

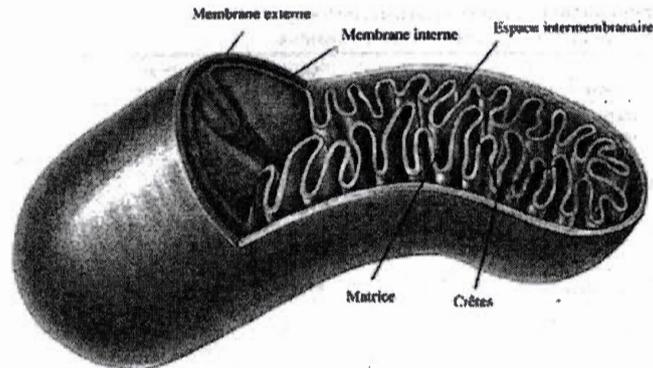


Figure 1.4.1 : Schéma d'une mitochondrie

Légende : Schéma de la structure d'une mitochondrie. Tiré de (Horton, 1994).

1.4.2 Le fonctionnement des mitochondries

1.4.2.1 La phosphorylation oxydative mitochondriale

La mitochondrie a pour rôle principal de convertir l'énergie contenue dans des coenzymes réduites en énergie utilisable pour le fonctionnement cellulaire grâce à la phosphorylation oxydative. Pour ce faire, des électrons provenant de coenzymes à fort potentiel réducteur (FADH_2 et NADH) générées par le cycle de Krebs, la Beta-oxydation et la glycolyse, sont utilisés par la chaîne respiratoire (aussi dénommée chaîne ou système de transfert des électrons). Cette chaîne est constituée d'une série de quatre complexes (de I à IV) insérés dans la membrane interne mitochondriale qui vont permettre le transport des électrons, d'un complexe à l'autre, en fonction de leur potentiel d'oxydoréduction croissant jusqu'à l'accepteur final, l'oxygène (Fig. 1.4.2.1). Ce transfert d'électrons libère une certaine quantité d'énergie qui va être utilisée par les complexes I, III et IV pour expulser des protons de la matrice mitochondriale vers l'espace inter-membranaire. L'accumulation des protons dans l'espace inter-membranaire permet l'établissement d'une force proton-motrice qui peut être utilisée par l'ATP synthase (aussi dénommée complexe V) pour synthétiser

l'ATP. Du fait de la conductivité naturelle de la membrane aux protons, de l'existence de protéines découplantes (UCP) et de transporteurs utilisant le gradient électrochimique de protons, il est important de noter que le rendement de la phosphorylation oxydative n'est pas parfait. Il existe donc un découplage naturel entre la consommation d'oxygène et la production d'ATP.

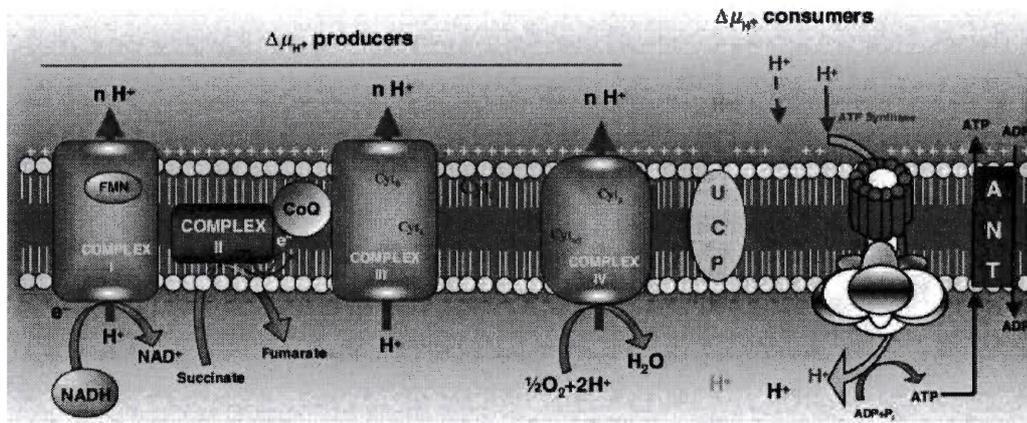


Figure 1.4.2.1 : Phosphorylation oxydative mitochondriale

Légende : Schéma illustrant le fonctionnement de la phosphorylation oxydative. Tiré de l'article (Silvestri *et al.*, 2005). **FMN**, Flavine Mono-Nucléotide; **Complex I**, NADH déshydrogénase; **Complex II**, succinate déshydrogénase; **Complex III**, Cytochrome c réductase; **Complex IV**, Cytochrome c oxydase; **e⁻** électrons; **H⁺**, protons; **CoQ**, Coenzyme Q; **NADH**, Nicotinamide Adénine Di-nucléotide réduit; **NAD⁺**, Nicotinamide Adénine Di-nucléotide oxydé; **Cyt_c**, cytochrome c; **Cyt_{a,a3,b,l}**, sites enzymatiques retrouvés au niveau des complexes III et IV; **UCP**, Protéines découplantes; **ADP**, Adénosine Di-Phosphate; **P_i**, Phosphate inorganique; **ATP**, Adénosine Tri-Phosphate; **ANT**, Adénine Nucléotide Translocase; **$\Delta\mu_{H^+}$** , gradient électro-chimique de protons.

1.4.2.2 La production mitochondriale de radicaux libres

Bien qu'également produits au niveau cytosolique, les radicaux libres, dont font partie les RLDO sont majoritairement produits au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale en tant que sous-produits de la respiration (Cadenas *et al.*, 2000). Le radical libre directement produit par la chaîne de transport d'électrons est l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$). Bien qu'étant le site principal d'utilisation de l'oxygène dans la cellule, le complexe IV (Cytochrome C oxydase) n'est pas impliqué dans la production d'anion superoxyde (Brand, 2010). En effet, ce complexe enzymatique réduit l' O_2 en eau (H_2O) dans une réaction de réduction faisant intervenir quatre électrons (Nicholls, 2013). Les deux sites principaux de production de l'anion superoxyde au niveau de la chaîne respiratoire sont les complexes I et III. Le complexe III est reconnu comme un des principaux producteurs de RLDO mitochondriaux (Kwong *et al.*, 1998). En effet, ce complexe reçoit des électrons de l'ubiquinole et les transfère au cytochrome C. Pour ce faire, l'ubiquinole est oxydée en radical semiquinone ($UQ^{\bullet-}$) au niveau du site Qp (inter-membranaire) du complexe III en donnant un électron à la protéine de Reiske qui par la suite le transfère au cytochrome C. L' $UQ^{\bullet-}$ ainsi formée réduit une molécule d'ubiquinone au niveau du site Qn (matriciel) du complexe III formant également un radical semiquinone à ce niveau. Ce radical est finalement réduit en ubiquinole par l'arrivée d'un autre électron provenant de l'oxydation d'une autre molécule d'ubiquinole au site Qp du complexe III. Le cycle ainsi formé permet la création d'un couple hautement réducteur qui serait impliqué dans la formation du radical superoxyde au niveau du site Qn (Turrens *et al.*, 1985).

Le complexe I (NADH déshydrogénase) de la chaîne respiratoire est également un siège de production d'anion superoxyde (Lambert *et al.*, 2004). Deux sites de production d'anion superoxyde ont été identifiés au niveau du complexe I : le site contenant la flavine mononucléotide (site liant le NADH), et le site de réduction de

l'ubiquinone. Aucune production d'anion superoxyde n'a été observée au niveau du complexe II (succinate déshydrogénase) (Brand, 2010). D'autres enzymes mitochondriales, telles que la pyruvate déshydrogénase, la 2-oxoglutarate déshydrogénase, l'ETF-ubiquinone oxido-réductase et la glycérol phosphate déshydrogénase, sont également capables de produire des anions superoxydes, mais dans une moindre mesure (Brand, 2010). Dans le cadre de cet avant-projet, je me limiterai à la production d'anion superoxyde au niveau des complexes I et III.

1.4.2.3 Les mitochondries dans la régulation de l'homéostasie calcique et de la mort cellulaire

Un autre rôle important de la mitochondrie au niveau cellulaire est sa capacité à réguler les flux calciques. En effet, cet organelle comporte des transporteurs de calcium (Ca^{2+}) qui permettent l'entrée des ions Ca^{2+} dans la matrice mitochondriale. Les mitochondries étant en relation étroite avec le réticulum endoplasmique (RE), réserve cellulaire calcique par excellence, elles jouent conséquemment un rôle important dans l'homéostasie calcique cellulaire. Au niveau mitochondrial, le Ca^{2+} matriciel module l'activité des déshydrogénases et par conséquent la production d'ATP. Par exemple, l'ion calcium active la pyruvate déshydrogénase (PDH). Une activation trop importante des déshydrogénases, telles que la PDH, pourrait mener à une production excessive de NADH et ainsi favoriser la production de radicaux libres par la chaîne respiratoire. L'entrée de calcium dans la mitochondrie se fait grâce au canal à anions dépendant du voltage (VDAC), qui permet aux ions de traverser la membrane externe mitochondriale et à l'uniport calcique, qui permet au calcium de traverser la membrane interne (Báthori *et al.*, 2006, Baughman *et al.*, 2011, De Stefani *et al.*, 2011). L'accumulation de calcium matriciel va permettre l'interaction de ce dernier avec la Cyclophiline D, ce qui cause l'ouverture du pore de transition de perméabilité (PTP) et donc la rupture de l'intégrité des membranes mitochondriales

et le relâchement du cytochrome C (Basso *et al.*, 2005). De plus, l'augmentation de calcium matriciel provoque une hausse de la production de RLDO, qui, eux aussi, peuvent déclencher l'ouverture du PTP. Cette dernière est à l'origine d'une baisse du potentiel membranaire mitochondrial (Hajnóczky *et al.*, 2006) et donc d'une altération de l'énergétique mitochondriale.

Le PTP représente un passage dans la structure bi-membranaire de la mitochondrie. Bien que la composition moléculaire exacte du PTP soit encore inconnue, il semble que son ouverture implique une interaction entre la Cyclophiline D, l'ANT (Adenine Nucleotid Translocase), une protéine de la membrane interne mitochondriale et VDAC, une protéine de la membrane externe mitochondriale (revue dans (Bernardi *et al.*, 1999)). La sortie des mitochondries du cytochrome C et d'autres facteurs pro-apoptotiques causée par l'ouverture du PTP aboutie à l'activation de l'apoptose (Liu *et al.*, 1996). Cette dernière fût définie pour la première fois par Kerr en 1972 en tant que mort cellulaire programmée (Kerr *et al.*, 1972). Il existe de nombreuses voies d'induction de l'apoptose, notamment intrinsèque et extrinsèque faisant intervenir différents facteurs d'induction. Je me limiterai, ici, aux voies intrinsèques déclenchées par les mitochondries qui sont au nombre de deux et peuvent être soit dépendante ou indépendante des caspases, les caspases étant des protéases à cystéine qui coupent les protéines au niveau d'un résidu aspartate (Yuan *et al.*, 1993).

La voie dépendante des caspases fait intervenir le relargage du cytochrome C par la mitochondrie (Liu *et al.*, 1996). Une fois sorti de la mitochondrie, le cytochrome C forme une structure nommée apoptosome en se liant à l'Apoptotic Protease Activating Factor-1 (APAF-1) et à la procaspase-9 (Hu *et al.*, 1998). L'apoptosome active par la suite la caspase-3 qui à son tour est responsable du déclenchement de la cascade d'évènements responsable de la dégradation de l'ADN nucléaire et donc de la mort cellulaire (revue dans (Peterson *et al.*, 2012)). La voie indépendante des

caspases, quant à elle, se fait après la libération par la mitochondrie du facteur d'induction apoptotique (AIF) et de l'endonucléase G (EndoG). Ces deux facteurs induisent également la condensation et la dégradation de l'ADN nucléaire (Peterson *et al.*, 2012). Il est important de souligner ici que le déclenchement de l'apoptose dans la plupart des cellules aboutit à la mort de ces mêmes cellules. Cependant, le déclenchement de l'apoptose dans les cellules musculaires peut avoir des conséquences beaucoup plus complexes car les cellules musculaires ont pour particularité d'être plurinucléées. Il est en général admis que le déclenchement de l'apoptose dans les cellules musculaires aboutit à la perte d'un ou plusieurs noyaux (Dupont-Versteegden, 2006). La perte d'une fibre musculaire par apoptose nécessite une activation prolongée et généralisée des voies apoptotiques.

Les mitochondries, parce qu'elles jouent des rôles importants dans le métabolisme énergétique, la production de radicaux libres, l'homéostasie calcique et la régulation de l'apoptose, sont essentielles au fonctionnement et à la survie des cellules musculaires.

1.4.2.4 Biogénèse mitochondriale, dynamique mitochondriale et mitophagie

Comme nous venons de le voir dans les sections précédentes, les mitochondries sont essentielles aux cellules musculaires. Trois processus principaux permettent de maintenir un fonctionnement optimal des mitochondries : la biogénèse mitochondriale, la dynamique des mitochondries et la mitophagie.

La régulation transcriptionnelle de la biogénèse mitochondriale est sous le contrôle de la famille des co-activateurs PGC1, dont l'activité est modulée par les statuts rédox (ratio $NAD^+/NADH$) et énergétique (ratio AMP/ATP) des cellules (Jäger *et al.*, 2007). La coordination des co-facteurs PGC1 et de facteurs de transcription tels que NRF1, NRF2 et tFAM régule l'expression des protéines mitochondriales (Jäger *et al.*, 2007). Des mutations des génomes mitochondrial ou nucléaire codant pour des protéines

mitochondriales ont été impliquées dans de multiples maladies allant du cancer, à des maladies neurodégénératives telles qu'Alzheimer ou Parkinson (Ross *et al.*, 2013).

Dans les cellules eucaryotes, la ségrégation de l'ADN mitochondrial (ADNm) se fait grâce à un processus continu de fusion et de fission des organites (Fig. 1.4.2.4) appelé dynamique mitochondriale (Detmer *et al.*, 2007). Deux des fonctions principales de la fusion consiste à permettre aux mitochondries de communiquer entre elles et également de supprimer les défauts qui apparaissent au cours du temps (Friedman *et al.*, 2014). La division, quant à elle, permet une meilleure distribution de l'organite dans la cellule donc une meilleure répartition de l'ADNm dans la cellule. Ces deux processus sont donc très importants pour l'homéostasie cellulaire. La rupture de cet équilibre a de sérieuses conséquences sur la survie cellulaire. En effet la perte de la fusion (fragmentation trop élevée du réseau) ou de la division (mitochondries trop grosses) entraîne des anomalies dans la chaîne respiratoire et des pertes d'ADNm (Friedman *et al.*, 2014).

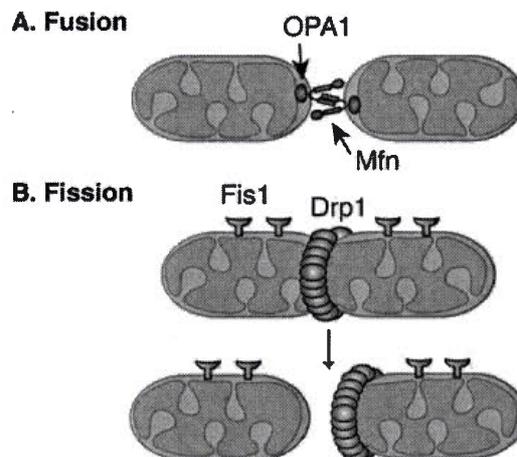


Figure 1.4.2.4.1 : Fusion et fission mitochondriale.

Légende : Schéma des protéines impliquées dans la fusion et la fission mitochondriales. Tiré du site internet (<http://jonlieffmd.com/blog/dynamic-relationship-of-mitochondria-and-neurons>). **OPA1**, Optic Atrophy 1 ; **Mfn**, Mitofusin ; **Fis1**, Fission 1 ; **Drp1**, Dynamin related protein 1.

La fusion et la division mitochondriales sont régulées par un groupe de GTPases, les Dynamin-Related Protein (DRP) (Fig. 1.4.2.4.1) (Friedman *et al.*, 2014). La division mitochondriale est assurée par DRP1 (Dnm1 chez les levures) alors que la fusion se fait grâce aux actions de plusieurs DRP dont MFN1, MFN2 et OPA1 (Meeusen *et al.*, 2004). Ces protéines sont également à l'origine du remodelage des membranes intracellulaires de nombreux organites (Friedman *et al.*, 2014). Afin que ce processus d'équilibre soit assuré au sein de la cellule, de nombreux systèmes de contrôle de qualité sont mis en place (Fig. 1.4.2.4.2). Le principal contrôle de qualité mitochondriale est la mitophagie, un processus permettant l'élimination par autophagie des mitochondries défectives. Ce processus, extrêmement complexe, sera abordé en détail ultérieurement.

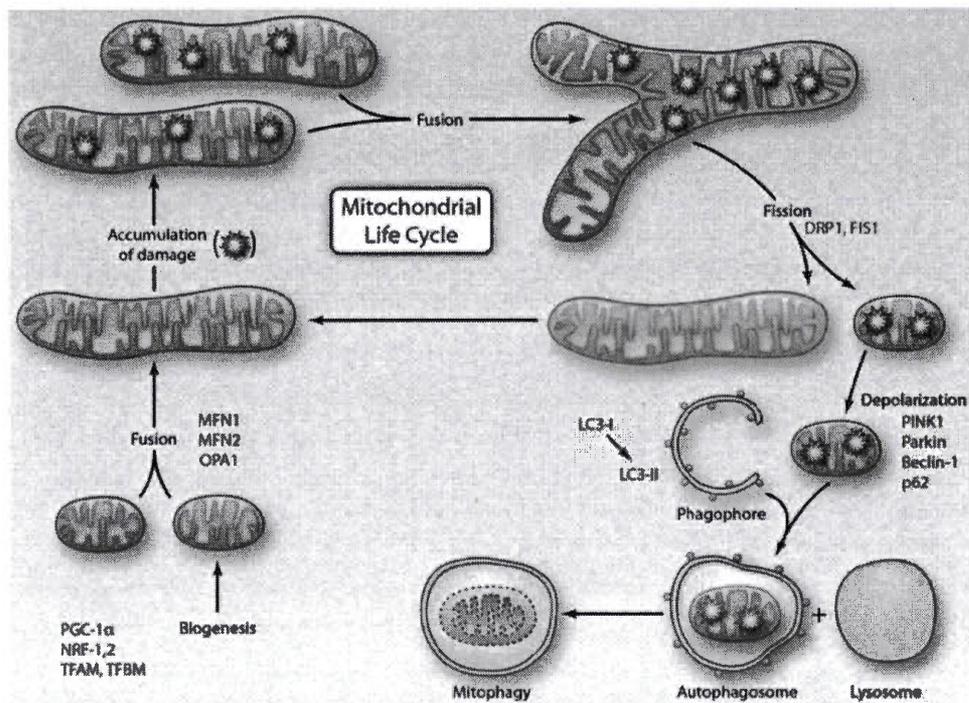


Figure 1.4.2.4.2 : Dynamique, biogénèse et mitophagie

Légende : Schéma résumant les trois processus principaux permettant de maintenir un fonctionnement optimal des mitochondries, tiré du site internet (<http://reasonandscience.heavenforum.org/t2131-the-mitochondrion>).

1.4.3 Énergétique mitochondriale et vieillissement musculaire

Bien que plusieurs études aient rapporté une absence d'effet du vieillissement musculaire sur l'activité maximale de la chaîne respiratoire (Frédéric Capel *et al.*, 2004, Hütter *et al.*, 2007, Kerner *et al.*, 2001, Rasmussen *et al.*, 2003), un consensus semble émerger ces dernières années sur le fait que l'énergétique mitochondriale est altérée au cours du vieillissement musculaire. Plusieurs études ont en effet rapporté que le vieillissement musculaire s'accompagne d'une réduction de la vitesse maximale de consommation d'oxygène, que ce soit chez l'homme (Tonkonogi *et al.*, 2003, Trounce *et al.*, 1989), le rat (Gouspillou *et al.*, 2010, Gouspillou *et al.*, 2014b, Kumaran *et al.*, 2005, Picard *et al.*, 2011, Zangarelli *et al.*, 2006) ou la souris (Figueiredo *et al.*, 2008, Lanza *et al.*, 2012). Il a été également mis en évidence, et ce de manière unanime, que la capacité maximale de production d'ATP par les mitochondries musculaires âgées était réduite chez l'homme (Short *et al.*, 2005), le rat (Drew *et al.*, 2003, Gouspillou *et al.*, 2010, Gouspillou *et al.*, 2014a, Scarabelli *et al.*, 2008, Zangarelli *et al.*, 2006) et la souris (Mansouri *et al.*, 2006). Récemment, Gouspillou *et al.*, ont également pu mettre en évidence, *in vivo* chez le rat, que la réponse des mitochondries de muscles âgés à une augmentation de la demande d'ATP est altérée (Gouspillou *et al.*, 2014a).

Des études relativement récentes ont également obtenu des données *in vivo* indiquant que le couplage de la phosphorylation oxydative est diminué lors du vieillissement (Amara *et al.*, 2007, Marcinek *et al.*, 2005). Ces données ont récemment été étayées par notre laboratoire qui a rapporté, dans une population

d'hommes âgés actifs et en utilisant la technique des fibres perméabilisées, des données indiquant un découplage modéré de la phosphorylation oxydative chez les hommes âgés (Gousspillou *et al.*, 2014b).

Prises dans leur ensemble, ces études indiquent donc que l'énergétique mitochondriale est altérée au cours du vieillissement. Cette altération de l'énergétique mitochondriale représente un mécanisme contribuant très probablement au déclin fonctionnel des muscles squelettiques lors du vieillissement.

1.4.4 Production de radicaux libres mitochondriaux et vieillissement musculaire

Comme nous l'avons vu précédemment, la mitochondrie est une des sources principales de radicaux libres cellulaires. Ces derniers, si produit en excès, peuvent causer des dommages oxydatifs à de nombreuses molécules et structures cytosoliques. Partant de ce constat, Harman a été le premier à émettre une théorie selon laquelle le vieillissement cellulaire pourrait être causé par une accumulation de dommages moléculaires à l'intérieur de la cellule due à l'action oxydante des sous-produits du métabolisme oxydatif (Harman, 1955). L'accumulation de dommages serait, selon la théorie de Harman, à l'origine d'un dysfonctionnement cellulaire et entraînerait le vieillissement de la cellule (Harman, 1955, Masoro, 2000). Harman étoffa par la suite sa théorie, en suggérant que les mitochondries, étant les productrices principales des radicaux libres dans la cellule, seraient les principales responsables de cette action oxydante (Harman, 1972). En lien avec cette théorie, de multiples études s'accordent sur le fait que le vieillissement musculaire est associé à une augmentation de marqueurs de stress oxydatif (Chabi *et al.*, 2008, Kovacheva *et al.*, 2010, Sinha-Hikim *et al.*, 2013, Wohlgemuth *et al.*, 2010, Yarian *et al.*, 2005). Plusieurs études ont également rapporté une augmentation de la production de RLDO par les mitochondries musculaires au cours du vieillissement chez l'homme (F Capel *et al.*, 2005, Dirks *et al.*, 2006), le rat (Chabi *et al.*, 2008) et la souris (Lanza *et al.*, 2012).

Renforçant la théorie de Harman, il a été récemment démontré que la surexpression de la catalase (une enzyme qui transforme le peroxyde d'hydrogène en eau et en dioxygène), spécifiquement dans les mitochondries, atténue les effets du vieillissement sur la force musculaire chez la souris (Umanskaya *et al.*, 2014).

Il est cependant important de noter ici que l'augmentation de la production mitochondriale de radicaux libres avec le vieillissement est une observation qui est loin de faire l'unanimité. En effet, un nombre non-négligeable d'études n'a trouvé aucune augmentation de la production mitochondriale de radicaux libres avec le vieillissement musculaire, que ce soit chez l'homme (Gousspillou *et al.*, 2014b, Hütter *et al.*, 2007) ou chez le rat (Picard *et al.*, 2010). Deux études récentes, qui se sont intéressées aux effets de suppléments en anti-oxydants ciblant spécifiquement les mitochondries (le MitoQ et SS-31), mettent également à mal l'implication d'une surproduction de radicaux dans le développement de la sarcopénie. Dans ces 2 études, où les suppléments en anti-oxydants ont été débutés avant l'apparition de l'atrophie et de la perte de force musculaires causées par le vieillissement et ont été maintenues pendant 15 semaines, aucun effet protecteur du MitoQ et du SS-31 contre la sarcopénie n'a été observé. Ces études remettent donc en cause l'importance des radicaux libres provenant des mitochondries dans le développement de la sarcopénie (Hou *et al.*, 2016, Sakellariou *et al.*, 2016).

Ainsi, bien que la plupart des études s'accordent sur le fait que le vieillissement musculaire est associé à l'apparition d'un stress oxydatif, l'implication des mitochondries dans ce processus reste incertaine.

1.4.5 Capacité mitochondriale de rétention en calcium, apoptose et vieillissement

Comme mentionné précédemment, les mitochondries jouent un rôle important dans l'homéostasie calcique cellulaire. Alors qu'une augmentation modérée de la concentration en calcium dans la matrice mitochondriale a un effet positif sur le

métabolisme oxydatif mitochondrial (e.g. stimulation de l'activité de multiples enzymes mitochondriales), une concentration calcique matricielle excessive peut résulter en une augmentation de la production de radicaux libres et un déclenchement de l'apoptose par ouverture du PTP. En étudiant la réponse des mitochondries face à un excès de calcium, il a été démontré chez le rat (Picard *et al.*, 2010) et chez l'homme (Gousspillou *et al.*, 2014b, Spendiff *et al.*, 2016) que le vieillissement musculaire s'accompagne d'une réduction de la capacité de rétention en calcium des mitochondries et d'une diminution du temps nécessaire à l'ouverture du PTP. Ces résultats indiquent que le vieillissement musculaire s'accompagne d'une sensibilisation du PTP, suggérant une propension accrue des mitochondries âgées au déclenchement de l'apoptose. Gousspillou *et al.* ont également rapporté que la proportion de noyaux positifs pour l'endonucléase G (un facteur pro-apoptotique normalement séquestré dans les mitochondries) était trois fois supérieures chez des hommes âgés en comparaison avec des hommes adultes et que la proportion de noyaux positifs pour l'endonucléase G chez les sujets âgés était corrélée au temps nécessaire à l'ouverture du PTP (Gousspillou *et al.*, 2014b). Ces résultats obtenus chez l'homme, et qui indiquent que le vieillissement musculaire s'accompagne d'une augmentation de l'apoptose contrôlée par les mitochondries, sont en lien avec des observations qui avaient été réalisées sur des modèles animaux (Chabi *et al.*, 2008, Leeuwenburgh *et al.*, 2005). En effet, Chabi *et al.* ont rapporté que les taux de relargage de cytochrome C et d'endonucléase G sont entre 3,5 et 7 fois supérieurs dans les mitochondries sous-sarcolemmales isolées à partir de muscle âgés par rapport à celles d'animaux jeunes adultes. Leeuwenburgh *et al.* ont quant à eux obtenu des données indiquant que le vieillissement musculaire chez la souris est associé à i) une augmentation du nombre de noyaux positifs pour le marquage TUNEL (un marquage détectant l'ADN clivé, un marqueur fiable d'apoptose), ii) une forte tendance ($p=0.052$) pour une augmentation de l'activité de la caspase 3, une caspase

activée par la sortie du cytochrome C de l'espace inter-membranaire, et iii) une translocation de l'endonucléase G au niveau nucléaire (Leeuwenburgh *et al.*, 2005).

Pris dans leur ensemble, ces résultats indiquent clairement que l'apoptose contrôlée par les mitochondries augmente lors du vieillissement musculaire. Cette augmentation de l'apoptose contrôlée par les mitochondries représente en conséquence un mécanisme plausible contribuant aux pertes de masse et de force musculaires survenant au cours du vieillissement.

Tel que détaillé précédemment, l'implication d'une surproduction mitochondriale de radicaux libres comme un mécanisme responsable du vieillissement musculaire, un pilier de la théorie de Harman, est actuellement sujette à controverse. Bien qu'il soit prématuré de l'écarter, cette controverse suggère que d'autres mécanismes cellulaires pourraient être impliqués dans l'accumulation de mitochondries dysfonctionnelles avec le vieillissement musculaire. Comme il sera détaillé par la suite, des études récentes suggèrent que des altérations de la mitophagie (le processus responsable de l'élimination des mitochondries dysfonctionnelles (Twig *et al.*, 2011, Youle *et al.*, 2011) pourraient être impliquées dans le développement de la sarcopénie.

1.5 Mitophagie et vieillissement musculaire

1.5.1 Généralités sur la mitophagie

La mitophagie représente l'élimination des mitochondries dysfonctionnelles. Elle fait partie intégrante de l'autophagie, et constitue littéralement l'autophagie des mitochondries. L'autophagie, du Grec « auto » soi-même et « phagy » manger, se réfère à tout processus cellulaire mettant en jeu la fusion d'un lysosome et d'une vésicule causant ainsi l'autodigestion d'une partie du contenu cellulaire (Levine *et al.*, 2008). Ce processus ne sert pas uniquement à éliminer les molécules ou organites

endommagés, mais permet également d'éliminer certains pathogènes et de fournir à la cellule certains nutriments lors de manque nutritionnel (Levine *et al.*, 2008). Ce mécanisme se produit de manière basale dans toutes les cellules de l'organisme (Levine *et al.*, 2008). Il est cependant rapidement mis à contribution en cas de manque nutritionnel ou de stress cellulaire.

Trois formes d'autophagies peuvent être décrites :

- L'autophagie médiée par des chaperonnes
- La micro-autophagie
- Et la macro-autophagie.

Cette dernière (à laquelle nous nous limiterons) représente le mécanisme autophagique principal utilisé par la cellule afin d'éliminer les protéines et les organites endommagés tels que les mitochondries. Ce type d'autophagie débute par la formation d'une vésicule d'isolation (le phagophore), qui va entourer une portion du cytoplasme (Levine *et al.*, 2008). Les deux extrémités du phagophore vont par la suite fusionner formant ainsi un autophagosome, vésicule à double membrane contenant le matériel cellulaire à éliminer (Levine *et al.*, 2008). Cette dernière est par la suite marquée, puis fusionne avec un lysosome pour former un autolysosome dont le contenu va être détruit par les enzymes lysosomales (Levine *et al.*, 2008).

L'autophagie répond également à différentes formes de stress métabolique, notamment l'hypoxie, le manque nutritionnel et la baisse de facteurs de croissance (Levine *et al.*, 2008). Ces derniers étant souvent impliqués dans la prise nutritionnelle, une baisse de ceux-ci entraîne l'activation de mécanismes de survie cellulaire dépendant de l'autophagie nécessaire pour pallier la baisse de la concentration intracellulaire en substrats énergétiques (Lum *et al.*, 2005). L'autophagie agit donc comme réponse adaptative catabolique et permet de produire des acides gras et des

acides aminés libres qui seront par la suite recyclés par la cellule en les amenant au niveau du cycle de Krebs afin de maintenir la production d'ATP (Levine *et al.*, 2008). Ceci permettant ainsi de maintenir un équilibre homéostatique constant. Bien que l'autophagie soit à l'origine considérée comme non sélective, il est maintenant reconnu que ce processus soit également hautement spécifique lors de l'élimination de structures pathogènes (bactériennes et virales) et d'organites cellulaires (Nakatogawa *et al.*, 2009).

De nombreux facteurs régulent l'autophagie. Noda *et al.* montrent en 1998 que l'autophagie semble être inhibée par la kinase TOR (Target Of Rapamycin) chez la levure. Cependant, dans le muscle, la kinase Akt en serait l'inhibiteur principal en bloquant l'activation de FoxO3 (Mammucari *et al.*, 2007, Zhao *et al.*, 2007). En effet, des analyses biochimiques montrent que l'inhibition de mTOR, par la Rapamicine, augmente faiblement (moins de 10%) la protéolyse; alors que cette dernière serait augmentée de 50% lors de l'inhibition d'Akt (Zhao *et al.*, 2007). En aval de ces deux enzymes se trouve une série de gènes identifiés comme ATG (Autophagy-related Genes) responsables du déclenchement du processus autophagique. Bien qu'étant 31 à avoir été signalés, 15 de ces gènes semblent être nécessaires au déclenchement de l'autophagie (Nakatogawa *et al.*, 2009). Des études plus poussées ont montré que les protéines codées par ces 15 gènes sont séparées en cinq groupes distincts : les kinases Atg1 (ULK1/2 chez les mammifères) et leurs régulateurs (Kamada *et al.*, 2000), les complexes phosphatidylinositol (PtdIns) 3-kinase (Kihara *et al.*, 2001), les systèmes de conjugaisons Atg12 (Mizushima *et al.*, 1998) et Atg8 (LC3 chez les mammifères) (Ichimura *et al.*, 2000) et un sous-groupe de protéines, plus ou moins bien caractérisées, agissant entre elles (Shintani *et al.*, 2001).

ULK1/2 est une kinase Ser/Thr protéique dont l'activité est essentielle lors de l'initiation de l'autophagie (Matsuura *et al.*, 1997). Son activité, augmentée par

association à la protéine Atg13 déphosphorylée (Kamada *et al.*, 2000), semblerait induire la formation de l'autophagosome en phosphorylant un ou plusieurs facteurs Atg (Nakatogawa *et al.*, 2009). Bien que chez la levure Atg1 semble phosphoryler plusieurs Atg, le mécanisme par lequel ceci entraînerait l'induction de l'autophagie reste encore inconnu (Nakatogawa *et al.*, 2009). Il semblerait également que chez la levure Atg1 soit régulé indirectement par TORC1 (l'un des deux complexes formants TOR) (Wullschleger *et al.*, 2006), car Atg13 est directement phosphorylé par ce dernier (Nakatogawa *et al.*, 2009). ULK1/2 étant l'homologue chez les mammifères d'Atg1, la relation entre TORC1 et Atg1 semble conservée chez tous les Eucaryotes afin de réguler l'autophagie (Klionsky, 2005). Par souci de concision et de simplicité, et le processus précis chez les mammifères n'ayant pas aussi bien été caractérisé, je me restreindrai à la description des mécanismes de formation autophagique observés chez les levures.

L'activité des PtdIns-3-kinases est essentielle à l'autophagie (Nakatogawa *et al.*, 2009), cependant elle n'a été décrite qu'au niveau des levures. Chez *S. cerevisiae* Vps34 est la seule PtdIns-3-kinase et forme deux complexes (le I formé de Vps34, Vps15, Vps30/Atg6 et Atg14; et le II formé de Vps38) essentiels au tri vacuolaire des protéines (Nakatogawa *et al.*, 2009). En effet Atg14 est nécessaire à la formation du complexe Atg2-Atg18, donc la formation de PtdIns-3P par le complexe I semble être obligatoire pour la formation de l'autophagosome (Nakatogawa *et al.*, 2009). La PtdIn-3P produite par le complexe I (de la PtdIns-3-kinase) semble être à l'origine du recrutement de protéines effectrices nécessaires à la formation de l'autophagosome (Nakatogawa *et al.*, 2009).

Les deux systèmes de conjugaisons Atg12 et Atg8 (Fig. 1.5.1) sont tous deux composés de protéines ayant les mêmes qualités que l'ubiquitine (Atg12 et 8 sont toutes deux attachées par leurs enzymes de conjugaison à leurs cibles respectives) et de trois

enzymes de conjugaisons (Atg3, Atg7 et Atg10) (Nakatogawa *et al.*, 2009). Alors qu'Atg12 se lie à Atg5, Atg8 (LC3 chez les mammifères) se lie à la Phosphatidyl-éthanolamine (PE), un des composants majeurs des membranes biologiques (Nakatogawa *et al.*, 2009). La formation du complexe Atg8-PE se fait grâce à deux enzymes d'ubiquitination de type E1 et E2 respectivement (Atg7 et Atg3) (Ichimura *et al.*, 2000). Atg4, une enzyme de dé-conjugaison, clive quant à elle le complexe Atg8-PE libérant ainsi Atg8 de la membrane (Ichimura *et al.*, 2000). La portion libre d'Atg8 va être recyclée alors que celle liée à la membrane de l'autophagosome est ingérée et dégradée par le lysosome (Ichimura *et al.*, 2000). La formation du complexe Atg12-Atg5 se fait également grâce aux enzymes de type E1 et E2 Atg7 et Atg10, cependant il semblerait qu'il n'existe aucune enzyme de dé-conjugaison dans ce cas (Ichimura *et al.*, 2000). Le complexe Atg12-Atg5 interagit par la suite avec Atg16 pour former le complexe Atg12-Atg5-Atg16, qui contrairement à Atg8-PE ne se trouve que sur la surface externe de la membrane (Ichimura *et al.*, 2000). Atg12-Atg5 agit directement sur l'E2 (Atg3) et augmente son activité ce qui lui confère une activité du genre ligase E3 lors de l'attachement de Atg8 à PE (Ichimura *et al.*, 2000). Cependant, et contrairement aux enzymes de type E3, Atg12-Atg5 n'est pas impliqué dans la spécification de la molécule à laquelle Atg8 est associée (Ichimura *et al.*, 2000). En plus de sa fonction dans la formation de la membrane de l'autophagosome, Atg8 joue un rôle lors de l'autophagie sélective. Dans les cellules de mammifères, p62 est responsable de la dégradation des protéines liées à l'ubiquitine par les autophagosomes mais elle est également responsable de l'autophagie sélective en se liant à l'équivalent d'Atg8 chez les mammifères : LC3 (Ichimura *et al.*, 2000).

kinase protéique entraîne le recrutement et l'activation subséquente de Parkin. La ligase de type E3 ainsi activée ubiquitine de nombreuses protéines membranaires mitochondriales activant ainsi le processus d'élimination de l'organite (Seirafi *et al.*, 2015). L'ubiquitination est un processus post-transcriptionnel servant au marquage de protéines par liaison covalente d'ubiquitine à des résidus lysine ou au groupe acide aminé N-terminal, afin de déclencher le mécanisme de dégradation protéique (Seirafi *et al.*, 2015). Ce mécanisme se fait grâce à l'action de trois familles d'enzymes : les enzymes d'activation de l'ubiquitine de type E1, les enzymes de conjugaison de l'ubiquitine de type E2 et les enzymes de liaison de l'ubiquitine de type E3 dont fait partie Parkin (Seirafi *et al.*, 2015). Il existe trois classes distinctes de protéines de liaison de l'ubiquitine de type E3 : les RING-types (Really Interesting New Gene, caractérisées par la présence d'un domaine liant l'E2 mais ne participant pas directement à la catalyse), les HECT-types (Homologous to the E6-AP Carboxyl Terminus, contenant un domaine ayant une cystéine active servant à accepter l'ubiquitine de l'E2 sous forme de thioester afin de la transférer au substrat) et les hybrides RING-HECT (RBR : RING-Between-RING; combinant les structures des deux premières) (Seirafi *et al.*, 2015).

1.5.3 Parkin

Parkin, une ligase RBR de type E3, ubiquitine une large variété de protéines cytosoliques et membranaires mitochondriales lors de la dépolarisation de la mitochondrie (Seirafi *et al.*, 2015). Ce marquage entraîne l'activation de la mitophagie (par recrutement de l'autophagosome) et du protéasome (Seirafi *et al.*, 2015). Parkin étant elle-même régulée par ubiquitination (Seirafi *et al.*, 2015). Elle est constituée d'un domaine Ubiquitine-like (Ubl) à son extrémité N-terminale et de quatre domaines RING-like coordonnés par le zinc : RING0, RING1 IBR et RING2 (Seirafi *et al.*,

2015) (Fig. 1.5.3). Parkin présente une structure enroulée grâce aux multiples liaisons hydrophobes qui la stabilisent (Seirafi *et al.*, 2015).

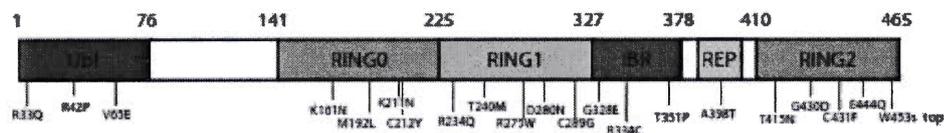


Figure 1.5.3 : Structure de Parkin.

Légende : Schéma résumant la structure globale de Parkin et montrant la succession des différents domaines réactionnels, tiré de l'article (Seirafi *et al.*, 2015).

Les domaines compris entre RING0 et RING2 comprennent chacun 2 ions zinc conférant ainsi une stœchiométrie de 8 ions zinc par molécule de Parkin (Seirafi *et al.*, 2015) Le domaine Ubl est impliqué dans la reconnaissance du substrat, la liaison au SH₃ et à l'association au protéasome. Le domaine RING1 sert de site de liaison à l'E2. Le domaine RING2 est le site catalytique comprenant la cystéine impliquée dans la réaction (Seirafi *et al.*, 2015). Le domaine IBR est commun à toutes les enzymes de type RBR E3, le domaine RING0 est quant à lui unique à Parkin (Seirafi *et al.*, 2015); cependant le rôle de ces deux domaines est pour le moment inconnu. Deux inter-domaines sont aussi présents. Le premier constitué de 70 résidus peu conservés suit directement le domaine Ubl. Tandis que le second, situé entre IBR et RING2, est constitué d'une hélice alpha (nommée REP : Repressor Element of Parkin) et se lie au domaine RING1 (Seirafi *et al.*, 2015).

Parkin est régulée par la présence d'ions zinc (qui assurent également une certaine stabilité structurale) et par de nombreux mécanismes d'auto-inhibition. Le plus important étant le bocage du site catalytique RING2 par RING0 (Seirafi *et al.*, 2015). Un second mécanisme d'inhibition est causé par le contrôle de la liaison de l'enzyme de type E2 en amont de la chaîne d'ubiquitination (Seirafi *et al.*, 2015). Des études ont

montré que le site de liaison de la ligase de type E2 se trouvait sur le domaine RING1, mais que ce domaine était bloqué par le domaine Ubl et le REP linker (Seirafi *et al.*, 2015). L'ubiquitination se passe en deux étapes : la première consiste en la formation d'un intermédiaire thioester d'ubiquitine et de cystéine dans lequel le C-terminal de l'ubiquitine lie de façon covalente la cystéine (Seirafi *et al.*, 2015) ; la deuxième étape consiste en un transfert de l'ubiquitine de Parkin vers un acide aminé du substrat (Seirafi *et al.*, 2015).

1.5.4 Relations entre PINK1 et Parkin

PINK1 agit en amont de Parkin et est nécessaire au recrutement et à l'activation de ce dernier (Fig. 1.5.4). Après dépolarisation de la membrane interne mitochondriale, l'accumulation de PINK1 au niveau de la mitochondrie entraîne une augmentation de son activité kinase causant la phosphorylation de Parkin et de l'ubiquitine (Seirafi *et al.*, 2015). En effet, PINK1 phosphoryle la sérine S65 du domaine Ubl entraînant ainsi l'activation de Parkin par dissociation des domaines Ubl et RING1 (Seirafi *et al.*, 2015). PINK1 phosphoryle également l'ubiquitine ainsi que les chaînes d'ubiquitine au niveau de la sérine S65, c'est-à-dire au même niveau que sur le domaine Ubl (Seirafi *et al.*, 2015) ce qui induirait une activation de Parkin par l'ubiquitine phosphorylée (Koyano *et al.*, 2014). Cependant la mono-ubiquitine attachée à la membrane mitochondriale ne semblerait pas être capable de recruter Parkin à elle seule ce qui suggère un rôle plus important des polymères d'ubiquitine (Wauer *et al.*, 2015). Les dissociations des liaisons entre RING0-RING2 et REP-RING1 entraînent l'activation de Parkin. Cependant, le site de liaison de la phospho-ubiquitine est pour le moment inconnu bien qu'il puisse être le même que celui retrouvé sur l'Ubl (Seirafi *et al.*, 2015). L'ubiquitine phosphorylée ainsi que la phosphorylation de Parkin par PINK1 entraîne l'augmentation de l'activité ligase de Parkin (Wauer *et al.*, 2015) et donc le marquage subséquent de protéines membranaires mitochondriales. Il est maintenant établi que

certaines protéines ubiquitinylées sont amenées aux autophagosomes via les protéines p62/SQSTM1 et NBR1, qui se lient aux chaînes d'ubiquitine et aux LC3 (Ichimura *et al.*, 2000) alors que d'autres suivent la voie du protéasome. Cependant, le mécanisme de sélection par lequel les protéines anormales sont éliminées reste inconnu (Sandri, 2010).

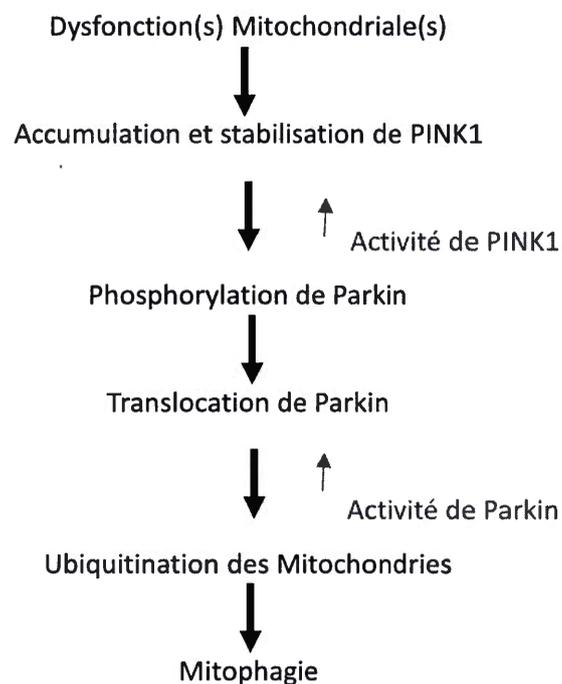


Figure 1.5.4 : Relations entre PINK1 et Parkin

Légende : Schéma du processus mettant en jeu l'activation de Parkin lors de la mitophagie. Adapté du site internet (<http://www.intechopen.com/books/cell-death-autophagy-apoptosis-and-necrosis/mitophagy-regulated-by-the-pink1-parkin-pathway>).

1.5.5 Mitophagie et vieillissement musculaire : un mécanisme hypothétique

Dans leur étude rapportant que le vieillissement musculaire est associé au déclenchement de l'apoptose contrôlée par les mitochondries, Gousspillou *et al.* ont également rapporté des résultats indiquant que la mitophagie pourrait être altérée lors du vieillissement musculaire. En effet, ces auteurs ont démontré que le rapport du contenu en Parkin (une protéine jouant un rôle clé dans la régulation de la mitophagie (Youle *et al.*, 2011) sur le contenu en VDAC (une protéine permettant le recrutement de Parkin sur les mitochondries dysfonctionnelles, une étape nécessaire pour l'initiation de la mitophagie (Sun *et al.*, 2012)) est réduit dans les muscles d'hommes âgés (Gousspillou *et al.*, 2014b). Ces résultats sont en lien avec les conclusions de travaux précédents qui ont également suggéré une altération globale des mécanismes autophagiques avec le vieillissement musculaire (Carnio *et al.*, 2014, O'Leary *et al.*, 2013, Wohlgemuth *et al.*, 2010). De plus, dans un article récent, Rana et ses collaborateurs montrent que la surexpression de Parkin entraîne une augmentation de la longévité de la drosophile associée à une augmentation de l'activité de la citrate synthase et une réduction des agrégats protéiques dans les muscles de drosophiles âgées (Rana *et al.*, 2013). L'ensemble de ces travaux suggèrent ainsi que le potentiel mitophagique pourrait être réduit lors du vieillissement musculaire. Cette altération possible du potentiel mitophagique représente un mécanisme cellulaire séduisant qui pourrait expliquer l'accumulation de mitochondries dysfonctionnelles avec le vieillissement musculaire. Cependant, l'implication possible d'une altération de la mitophagie dans le développement de la sarcopénie est une hypothèse qui n'a à l'heure actuelle jamais été testée par une approche mécanistique.

1.6 Objectifs et hypothèses

À la lumière de notre revue de la littérature, il apparaît clairement que le vieillissement musculaire s'accompagne d'une accumulation de dysfonctions mitochondriales, incluant une altération de l'énergétique mitochondriale, une moindre capacité de rétention calcique, une sensibilisation du PTP et un déclenchement de l'apoptose. Alors que le ou les mécanismes sous-jacents restent à l'heure actuelle peu clair(s), des études récentes suggèrent qu'une réduction du potentiel mitophagique pourrait être causalement impliquée dans cette accumulation de dysfonctions mitochondriales, et notamment une diminution du ratio Parkin sur VDAC (Gouspillou *et al.*, 2014b). En se basant sur ce cadre théorique, l'objectif principal de cette étude sera de déterminer, chez la souris, l'impact de la surexpression de Parkin, dans le but de stimuler la mitophagie, sur le développement de la sarcopénie. Pour ce faire, nous déterminerons dans les muscles *Tibialis Anterior* et *Gastrocnemius* de souris jeunes et âgées, les effets de la surexpression de Parkin sur :

- (i) L'activité et l'expression d'enzymes mitochondriales et la sensibilité des mitochondries au déclenchement de l'apoptose
- (ii) La morphologie et la dynamique des mitochondries
- (iii) La masse des muscles et la taille des fibres musculaires

Nous émettons les hypothèses suivantes :

- Dans les muscles de souris jeunes adultes, puisqu'aucune dysfonction mitochondriale n'est attendue, nous émettons l'hypothèse que la surexpression de Parkin n'aura aucun effet sur la morphologie et la dynamique des mitochondries, la masse des muscles et la taille des fibres musculaires.
- Dans les muscles de souris âgées, nous émettons l'hypothèse que la surexpression de Parkin permettra d'atténuer les effets du vieillissement sur

l'activité et l'expression des enzymes mitochondriales, la morphologie et la dynamique des mitochondries, la masse des muscles et la taille des fibres musculaires.

Si nos hypothèses sont vérifiées, le présent projet de recherche permettra non seulement d'accroître notre compréhension des mécanismes causant la sarcopénie, mais pourrait également identifier Parkin comme une cible thérapeutique pour contrer le développement de la sarcopénie.

CHAPITRE II

MÉTHODES

2.1 Animaux

Les animaux de notre étude étaient des souris communes (*Mus musculus*) C57BL/6J mâles, âgées de 3 ou 18 mois. Alors que les souris jeunes (3 mois) ont été obtenues auprès de la compagnie Jackson Laboratories, les souris âgées (18 mois) ont été obtenues auprès du Réseau Québécois de Recherche sur le Vieillissement (RQRV), grâce à leur colonie de souris vieillissantes. De leurs réceptions à leurs sacrifices (4 mois), ces souris ont été hébergées dans un environnement contrôlé (cycle lumière/pénombre de 12h, et une température de 22°C) et nourries (*ad libitum*) à l'animalerie de l'Université du Québec À Montréal (UQAM) située au pavillon Président-Kennedy. Toutes les expérimentations, incluant la transduction, le prélèvement des tissus, l'euthanasie/sacrifice des souris, l'utilisation des tissus ainsi que l'analyse des données, à l'exception de la microscopie électronique (MET) réalisée à l'Université de Montréal, ont été réalisées au département de Sciences de l'Activité Physique de l'UQAM. Il est important de noter que le présent projet de recherche a été validé par le comité éthique de l'UQAM (numéro de protocole éthique : CIPA883). Pour notre groupe de souris âgées, nous avons choisi d'utiliser des souris âgées de 18 mois car à cet âge, aucun marqueur de sarcopénie n'était encore détectable alors qu'à 22 mois (âge auquel les souris seront sacrifiées) la sarcopénie était établie (Hwee *et al.*, 2014). Nos souris jeunes ont servi de contrôle afin d'établir l'effet de la surexpression de Parkin dans un muscle adulte en pleine santé.

Pour réaliser ces injections, les souris ont été anesthésiées avec de l'isoflurane. Les injections intramusculaires ont été réalisées à l'aide d'une seringue à insuline (29-gauge insulin syringe). Deux injections ont été pratiquées, une première trois jours après réception des souris, et une deuxième 8 semaines après la première inoculation. Chaque injection était de 25µl afin d'obtenir un total de $2,5 \times 10^{11}$ copies de vecteurs par muscle inoculé.

Quatre mois après la première injection des VAA, les souris ont été anesthésiées à l'isoflurane. Les muscles TA et GAS des pattes gauches et droites ont été prélevés et pesés. Chaque muscle a été coupé en deux. Une des deux moitiés a été montée sur des blocs en liège dans de la gomme Tragacanthé et gelée dans de l'isopentane préalablement refroidi dans de l'azote liquide avant d'être conservée jusqu'à utilisation à -80°C (Gouspillou *et al.*, 2014b). Ces blocs, ainsi obtenus, ont été utilisés pour les analyses histologiques et immunohistochimiques. De la deuxième moitié des GAS a été prélevée de fines lanières de muscles blancs (glycolytiques) qui ont été utilisées pour l'étude de la morphologie mitochondriale à l'aide de la MET. Le tissu restant, des muscles TA et GAS, a été congelé dans de l'azote liquide et conservé à -80°C . Ce tissu a été utilisé pour la quantification du contenu en protéines d'intérêt par immunobuvardage.

2.3 Analyses histologiques et immunohistochimiques

2.3.1 Analyse du phénotype musculaire (taille et proportion des différents types de fibres)

Des coupes de 8µm d'épaisseur ont été réalisées à partir des blocs congelés et immunomarquées afin d'identifier les chaînes lourdes de myosine de types I, Iia et Iib selon un protocole décrit précédemment (Gouspillou *et al.*, 2014c). Les coupes ont été réhydratées avec du PBS (pH 7,2) à température ambiante, puis bloquées au

sérum de chèvre (10% dans du PBS) et incubées pendant une heure à température ambiante dans un cocktail d'anticorps primaires (Developmental Studies Hybridoma Bank, DSHB, Université de l'Iowa, Iowa City IA, USA) composés d'anticorps de souris IgG2b monoclonal anti-MHC type I (BA-F8, 1:25), IgG1 monoclonal anti-MHC type IIa (SC-71, 1:200), IgM monoclonal anti-MHC de type IIb (BF-F3, 1:200) et d'anticorps de lapin IgG polyclonal anti-laminin (Sigma-Aldrich L9393). Les coupes ont par la suite été lavées trois fois 5 minutes au PBS avant d'être incubées 1 heure à température ambiante dans le cocktail d'anticorps secondaires suivant : Alexa Fluor 350 IgG2b (γ 2b) anticorps de chèvre anti-souris (A-21140, 1:500; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), Alexa Fluor 594 IgG1 (γ 1) anticorps de chèvre anti-souris (A-21125, 1:100; Invitrogen), Alexa Fluor 488 IgM anticorps de chèvre anti-souris (A-21042, 1:500; Invitrogen), and Alexa Fluor 488 IgG anticorps de chèvre anti-lapin (A-11008, 1:500; Invitrogen). Les coupes ont été encore lavées trois fois au PBS puis mises sous lamelles avec du Prolong Gold (P36930, Invitrogen). Des images de ces coupes musculaires ont été ensuite acquises à l'aide d'un microscope à fluorescence Zeiss Axio Imager 2. Des régions d'intérêt ont été sélectionnées de manière systématique pour analyse de la taille et de la proportion des différents types de fibre musculaire. Ces analyses furent réalisées à l'aide du logiciel ImageJ (NIH).

2.3.2 Immunomarquage pour PGC1- α et 4-Hydroxynonenal (4HNE)

Des coupes de 8 μ m d'épaisseur ont été également réalisées à partir des blocs congelés et cette fois, immunomarquées afin de quantifier *in situ* le contenu en PGC1- α (un régulateur de la biogénèse mitochondriale) et en 4HNE (un marqueur de peroxydation lipidique sensible au stress oxydant). Ces coupes ont tout d'abord été ramenées à température ambiante puis fixées dans de l'acétone à 4°C pendant 15 minutes (Gouspillou *et al.*, 2014c). Elles ont par la suite été rincées trois fois 5 minutes au PBS (pH 7,2) avant d'être perméabilisées avec du Triton-X100 (1% dans du PBS) 15

minutes (Gouspillou *et al.*, 2014c). Après les avoir à nouveau rincées dans du PBS (3 fois 5 minutes), elles ont été bloquées avec du sérum de chèvre 10% dans du PBS à température ambiante pendant 15 minutes (Gouspillou *et al.*, 2014c). Les lames furent ensuite incubées pendant 1 heure avec un anticorps polyclonale IgG de lapin anti-PGC-1 α (Millipore, Ab3242, 1:50) ou un anticorps monoclonal anti-HNE de souris (#HNE 13-M; 1 :100; Alpha Diagnostic International) (Gouspillou *et al.*, 2014c). Ces lames ont à nouveau été rincées trois fois 5 minutes avec du PBS et incubées 90 minutes, à température ambiante, avec un anticorps anti-lapin IgG de chèvre Alexa Fluor 488 (A-11008, 1:500) ou un anticorps anti-souris IgG de chèvre Alexa Fluor 488 (A-32723; 1 :500) (Gouspillou *et al.*, 2014c). Elles ont été lavées trois fois 5 minutes au PBS puis placées sous lamelles avec un agent anti-décoloration (Prolong Gold, Invitrogen, P36930) (Gouspillou *et al.*, 2014c). Des images de ces coupes musculaires ont ensuite été acquises à l'aide d'un microscope à fluorescence Zeiss Axio Imager 2. Les analyses de ces images ont été réalisées à l'aide du logiciel ImageJ (NIH).

2.3.3 Détermination *in situ* de l'activité de la Succinate DéHydrogénase (SDH)

Des coupes de muscle de 8 μm ont été utilisées afin d'effectuer un marquage SDH. Ce marquage fût utilisé afin de quantifier l'activité de la SDH *in situ*, un marqueur fiable du contenu en mitochondries (Gouspillou *et al.*, 2014c). Après avoir été ramenées à température ambiante, les coupes ont été réhydratées avec du PBS (pH 7,4), puis incubées dans une solution contenant du Nitroblue tetrazolium (1,5 mM), du succinate de sodium (130 mM), du méthosulphate de phénazine (0.2 mM) et de l'azide de sodium azide (0.1 mM) pendant 20 minutes (Gouspillou *et al.*, 2014c). Elles ont ensuite, été lavées trois fois au PBS, et déshydratées dans de l'éthanol 75% (30 secondes), 90% (30 secondes) et 100% (10 minutes) (Gouspillou *et al.*, 2014c). Elles ont par la suite été montées sous lamelles avec un médium aqueux (Vector Labs, VectaMount AQ Medium, H-5501) (Gouspillou *et al.*, 2014c). Il est à noter que toutes

les coupes ont été incubées dans le même milieu d'incubation et pendant le même temps, afin d'assurer les mêmes conditions d'expérimentation. Des images furent ensuite acquises à l'aide d'un microscope (Zeiss Axio Imager 2) et analysées à l'aide du logiciel ImageJ (NIH).

2.3.4 Détection de l'apoptose par marquage TUNEL

L'indicateur principal de l'apoptose cellulaire est la présence de fragments d'ADN, double hélice de 180 à 200 paires de bases, obtenus lors de la fragmentation du génome par les endonucléases (Kyrilkova *et al.*, 2012). La Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) d'UTP Nick-End Labeling (TUNEL) est une méthode de marquage utilisée afin de localiser ces fragments d'ADN obtenus lors de l'apoptose. Cette technique a été décrite pour la première fois en 1992 par Gavrieli (Gavrieli *et al.*, 1992). Ce marquage consiste en l'ajout par la TdT (l'enzyme Terminal deoxynucleotidyle transferase) de d'UTP marqué (déoxy Uracile Tri-Phosphate) à la terminaison 3'-hydroxyle des fragments d'ADN double brin afin d'être visualisé par immunohistochimie (Negoescu *et al.*, 1996). Dans notre cas, le kit TUNEL Abcam (Red Fluorescence In situ BrdU (Bromolated DeoxyUridine) Fragmentation; ab66110), du Br-d'UTP (Bromolated DeoxyUridine Triphosphate Nucleotides) a été utilisé afin d'incorporer l'ADN et de servir de marqueur.

Des coupes de 8µm ont été réalisées au cryostat à partir de nos blocs d'histologie. Elles ont, par la suite, été placées, par trois, sur des lames de microscopes (Fisherbrand, Superfrost Plus) et rincées deux fois avec du PBS pendant 5 minutes. Les coupes ont ensuite été fixées au paraformaldéhyde (4%) dans du PBS pendant 15 minutes, puis à nouveau rincées au PBS (2x 5minutes). Après avoir enlevé l'excès de PBS, chaque section a été traitée avec 100 µl de protéinase K (préparé en mélangeant 2 µl de Prot K 10 mg/ml + 998 µl de TrisHCl 100 mM de pH 8,0 + de l'EDTA 50 mM EDTA) et incubée pendant 5 min à température ambiante dans du PBS. Les coupes

ont, par la suite, été lavées à nouveau deux fois au PBS et refixées au paraformaldéhyde (4%) dans du PBS pendant 5 minutes cette fois. Deux lavages subséquents au PBS ont été de nouveau faits, puis les lames furent placées sous lamelles avec 100µl de tampon d'équilibration (fourni par le fabricant) et incubées de 5 à 10 minutes. Passé ce temps, les lamelles ont été enlevées et 100µl du mélange de réaction TdT (préparé selon le mélange présenté dans le tableau 2.3.4) ont été ajoutées aux lames avant que ces dernières ne soient incubées à 37°C pendant 60 minutes.

Tableau 2.3.4: Protocole de fabrication du mélange de réaction TdT

DNA Labeling Solution	1 assay	10 assays
TdT Reaction Buffer	10 µL	100 µL
TdT Enzyme	0.75 µL	7.5 µL
Br-dUTP	8 µL	80 µL
ddH ₂ O	32.25 µL	322.5 µL
Total Volume	51 µL	510 µL

Après incubation, les lames ont été lavées deux fois 5 minutes au PBS. Elles ont, par la suite, été incubées à température ambiante sous humidité, sous lamelles, avec 100 µl de la solution d'anticorps (5 µL d'Anti-BrdU-Red Antibody + 95 µl de tampon de rinçage fourni par le fabricant) pendant 30 minutes à l'obscurité. Elles ont été lavées deux fois 5 minutes à l'eau distillée puis placées sous lamelles avec un agent anti-décoloration (Prolong Gold, Invitrogen, P36930). Puis des images furent acquises à l'aide d'un microscope confocal (Nikon).

2.4 Immunobuvardage

Trente à 40 mg de muscle ont été homogénéisés dans 10 fois leur volume de tampon d'extraction contenant 50 mM de Tris base, 150 mM de NaCl, 1% de Triton X-100, du sodium deoxycolate à 0.5%, 0.1% de SDS, et 10 µl/ml d'un cocktail d'inhibiteur de protéase (P8340; Sigma, St. Louis, MO, USA) (Gouspillou *et al.*, 2014b). L'homogénat fût centrifugé à 15 000g pendant 15 minutes à 4°C. Le contenu en protéines du surnageant a été déterminé par test de Bradford en utilisant une solution titrée d'albumine sérique de bovin comme standard (Gouspillou *et al.*, 2014b).

Du tampon Laemli 4X a été ajouté à ces extraits de surnageant afin d'obtenir une concentration protéique de 1,5 mg/ml. Ces échantillons ainsi préparés ont été ensuite chauffés à 95°C pendant 5 minutes (Gouspillou *et al.*, 2014b). Trente µg de protéines ont été, par la suite, placés dans des puits de gels électrophorétiques SDS-PAGE 8 ou 12% puis transférés sur une membrane de fluorure de polyvinylidène (PVDF) (Gouspillou *et al.*, 2014b). Les membranes furent bloquées 1h à température ambiante dans un mélange de lait 5% et de TBS-T (Tris-Buffered Saline + 0,1% Tween 20), puis incubées durant la nuit à 4°C avec les anticorps primaires suivants : anticorps monoclonal anti-NDUFB8 de souris (complexe I; Ab110242, 1:250; Abcam, Cambridge, MA, USA), anticorps monoclonal anti-SDHB de souris (complexe II; Ab14714, 1:250; Abcam), anticorps anti-UQCRC2 de souris (Complexe III, ab14745, 1:250; Abcam), anticorps monoclonal anti-MTCO1 de souris (Complexe IV, ab14705 1:250; Abcam), anticorps monoclonal anti-ATP5A de souris (ATP synthase, ab14748, 1:250; Abcam), anticorps monoclonal anti-PRK8 de souris (Parkin, sc32282; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), anticorps monoclonal anti-S6 Ribosomal Protein de souris (54D2) (Cell Signaling, #2317; 1 :500; Cell Signaling), anticorps polyclonal anti-Phospho-S6 Ribosomal Protein (Ser240/244) de lapin (Cell Signaling #2215; 1 :500 ; Cell Signaling), anticorps polyclonal anti-LC3A/B de lapin (Cell Signaling #4108; 1 :500 ;

Cell Signaling), anticorps polyclonal anti-SQSTM1/p62 de lapin (Cell Signaling #5114; 1 :500 ; Cell Signaling), anticorps monoclonal anti-DRP1 de souris (ab56788; 1 :500; Abcam), anticorps monoclonal anti-TFAM de souris (ab198307; 1 :500; Abcam) anticorps polyclonal anti-MFN2 de lapin (ab50843; 1 :500; Abcam), anticorps monoclonal anti-4Hydroxynonenal (4-HNE) de souris (MAB3249; 1 :500; Biotechne), anticorps polyclonal anti-EndoG de lapin (ab9647; 1 :500; Abcam) et un anticorps monoclonal anti-VADC de souris (Ab14734, 1:500; Abcam) dilués dans du tampon de blocage (Gouspillou *et al.*, 2014b). Les membranes ont été, par la suite, lavées 6 fois au TBS-T pendant 5 minutes avant d'être incubées, 1h à température ambiante, avec des anticorps secondaires (anti-lapin Ab6721, 1:5000; anti-souris Ab6728, 1:5000; Abcam) conjugués à la HRP également dilués dans du tampon de blocage (Gouspillou *et al.*, 2014b).

La détection a été réalisée par chémiluminescence grâce au système d'imagerie ChemiDoc Touch Imaging System de Biorad. Nos résultats furent normalisés par rapport aux protéines totales détectées sur chaque membrane, grâce au marquage Ponceau S (3-Hydroxy-4-(2-sulfo-4-[4-sulfophenylazo] phenylazo)-2,7 sel sodique d'acide naphthalénedisulfonique), un colorant de couleur rouge se liant aux protéines (Bannur *et al.*, 1999), (Ponceau S stain total detection de Biorad) ou grâce à la technologie Stain Free de Biorad (Mini PROTEAN® TGX Stain Free™ Gels).

2.5 Microscopie électronique

L'étude de la morphologie mitochondriale a été réalisée grâce à la microscopie électronique par transmission. Notre protocole est une adaptation des procédures décrites dans (Picard *et al.*, 2013a; Picard *et al.*, 2013b).

Les échantillons de GAS blanc prélevés ont été immédiatement fixés dans une solution tampon de glutaraldéhyde 2% dans du cacodylate 0,1M de pH 7,4 (Picard *et al.*,

2013b). Ils ont été subséquemment fixés pendant une heure dans une solution de tétr oxyde d'osmium 1%, avant d'être déshydratés dans des bains successifs d'acétone de concentrations différentes (25, 50, 75 et deux fois 100%) (Picard *et al.*, 2013b). Ils ont été, par la suite, imprégnés de résine diluée dans de l'acétone, par trempage, sur une période de 24h, dans des bains de concentrations croissantes (25, 50, 75 et trois fois 100%) (Picard *et al.*, 2013b). Nos échantillons furent coupés en segments plus petits et incorporés selon une orientation longitudinale ou transverse, dans de la résine 100% à 60°C pendant 24h (Picard *et al.*, 2013b). Des coupes de 70nm ont été réalisées grâce à un ultramicrotome (Leica EM UC7) avant d'être traitées au chloroforme et montées sur des films Pioloform-copper (AGS134-6, Agar Scientific) et marquées à l'acétate d'uranyle aqueux 2% et au citrate de plomb (Picard *et al.*, 2013b). Elles ont été par la suite, imagées au microscope électronique (Philips CM100, FEI) grâce à une caméra digitale (AMT XR80 CCD).

Des régions d'intérêts furent déterminées aléatoirement à partir de ces images. Les mitochondries subsarcolemmales et intermyofibrillaires ont été tracées manuellement à l'aide du logiciel ImageJ (NIH) afin de quantifier l'aire (en μm^2), le périmètre (en μm), la circonférence ($4\pi \times [\text{aire} / (2 \times \text{périmètre})]$) et le diamètre de Feret (la plus grande distance entre deux points à l'intérieur d'une même mitochondrie). Ces images nous ont permis également de quantifier la densité mitochondriale.

2.6 Analyses statistiques

Afin d'assurer un maximum de transparence de nos résultats, nos graphiques présentent toutes les données individuelles et indiquent clairement toutes les paires d'échantillons (e.g. pour chaque animal, les données du muscle exprimant la GFP vs celle des muscles exprimant le couple GFP et Parkin sont reliées par un trait fin). À

· moins que cela ne soit mentionné dans la figure, les analyses sont réalisées comme suit : dans chacun de nos groupes d'âge (e.g. 7 et 22 mois), les comparaisons entre les muscles exprimant la GFP vs les muscles exprimant le couple GFP et Parkin ont été réalisées à l'aide de tests de Student (t-test) bilatéraux appariés. Pour étudier les effets du vieillissement, les muscles exprimant la GFP dans le groupe des animaux jeunes et dans le groupe des animaux âgés ont été comparés à l'aide de tests de Student bilatéraux non-appariés. Nos analyses ont été réalisées sur le logiciel GraphPad Prism 5 (GraphPad Software 5, San Diego, CA, USA). Le seuil de significativité a été fixé à $p < 0,05$.

CHAPITRE III

RÉSULTATS

3.1 Caractéristiques des animaux

Lors de notre protocole d'inoculation des VAA, deux injections ont été pratiquées. Une première, une semaine après réception des souris et une deuxième, huit semaines après la première. Afin de caractériser l'évolution du poids des souris, nous les avons pesées lors de ces deux interventions. Les souris jeunes montraient une légère prise de poids au cours du temps, alors que chez nos souris âgées, le poids est resté relativement stable (Fig. 3.1).

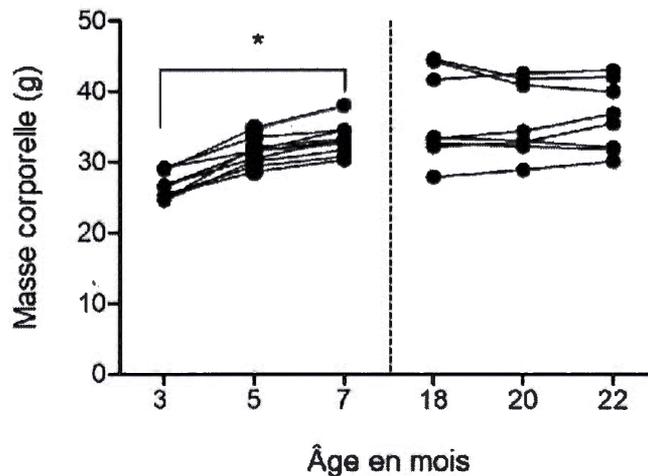


Figure 3.1 : Évolution du poids à 3, 5 et 7 mois pour les souris jeunes et à 18, 20 et 22 mois pour les souris âgées

Légende : Les résultats de l'évolution du poids sont présentés par souris à 1, 8 et 16 semaines après leur arrivée. Les analyses statistiques ont été effectuées par analyse de la variance à un facteur, suivie de tests de comparaison multiple de Tukey. Les valeurs de p inférieures à 0,05 sont considérées significativement différentes.

3.2 Surexpression de Parkin

Afin de vérifier si Parkin a été surexprimée dans les pattes ayant été injectées avec le VAA-Parkin, nous avons effectué des analyses du contenu protéique par immunobuvardage (Fig. 3.2.A). Nos résultats montrent un contenu en Parkin très largement supérieur dans les muscles ayant été inoculés par le virus exprimant Parkin (7m-Parkin et 22m-Parkin) comparativement aux muscles contrôles chez les souris jeunes (7m-GFP) et âgées (22m-GFP) (Fig. 3.2.B). Nos résultats indiquent également une tendance à la baisse du contenu en Parkin avec l'âge (7m-GFP vs. 22m-GFP (Fig. 3.2.C))

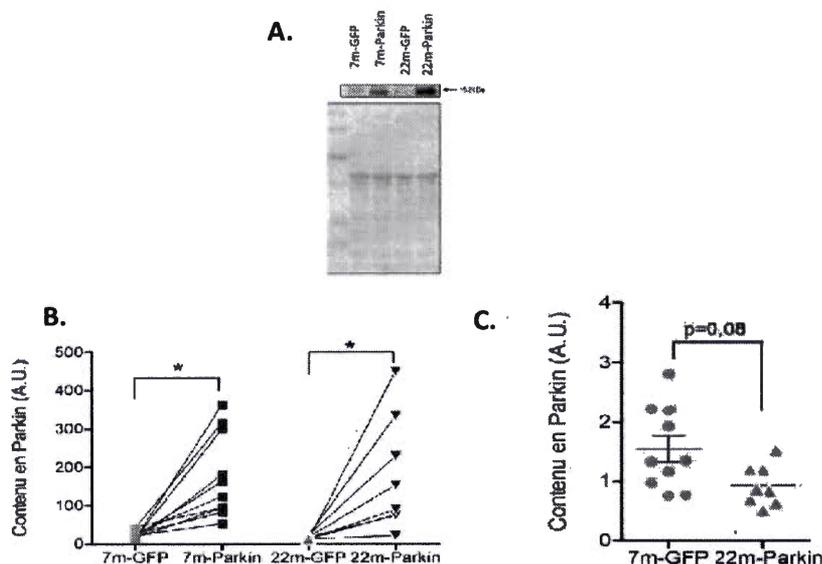


Figure 3.2 : L'inoculation du VAA Parkin provoque une augmentation du contenu en Parkin dans les muscles TA de souris jeunes et âgées

Légende : A) Immunobuvardage représentatif utilisé pour quantifier le contenu en Parkin (révélation par ECL en haut, marquage par Ponceau S en bas). B) Quantification du contenu en Parkin dans les muscles TA de souris jeunes (n=10) et de souris âgées (n=8), normalisé par rapport à l'intensité du marquage au Ponceau S. C) Quantification du contenu en Parkin dans les muscles TA contrôles de souris jeunes et âgées, normalisé par rapport à l'intensité du marquage au Ponceau S.

3.3 Effet de la surexpression de Parkin sur le poids des muscles TA et GAS

La collecte des muscles en fin d'expérience a permis de quantifier le poids des muscles TA et GAS chez nos souris jeunes et âgées (Fig. 3.3.1). Nos résultats indiquent que les poids des TA et des GAS contrôles chez les souris jeunes (7m-GFP) étaient significativement supérieurs aux poids des mêmes muscles chez les souris âgées (22m-GFP) (Fig. 3.3.1). Les poids des TA des pattes surexprimant Parkin (7m-Parkin et 22m-Parkin) étaient significativement supérieurs aux poids des TA des pattes contrôles (7m-GFP et 22m-GFP) chez les souris jeunes et âgées (Fig. 3.3.1.B), alors que pour ce qui est des muscles GAS, les muscles surexprimant Parkin (7m-Parkin) étaient significativement plus gros chez les souris jeunes et montraient une forte tendance au gain de poids chez les souris âgées (22m-Parkin) (Fig. 3.3.1.A). Par la suite, nous avons fait un ratio des poids des TA de nos différents états par rapport à ceux des TA des pattes GFP des souris jeunes (Fig. 3.3.2). Nos résultats montraient un gain significatif de poids des TA dans les pattes exprimant Parkin chez les souris jeunes (7m-Parkin) (Fig. 3.3.2). Les poids des TA-GFP des souris âgées étaient significativement inférieurs aux poids des TA-GFP des animaux jeunes alors qu'aucune différence significative n'était à noter entre les TA des souris âgées surexprimant Parkin et le TA contrôle des souris jeunes (Fig. 3.3.2).

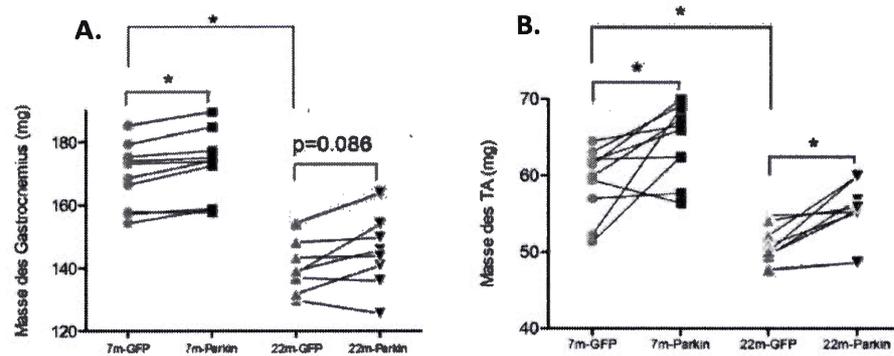


Figure 3.3.1 : Effet du vieillissement et de la surexpression de Parkin sur le poids des muscles *Tibialis anterior* et *Gastrocnemius* (analyse contrôle montrant que la masse n'est pas altérée par la GFP)

Légende : A) Poids des muscles GAS en fonction de la surexpression ou non de Parkin chez les souris jeunes (7 mois) et âgées (22 mois). B) Poids des muscles TA en fonction de la surexpression ou non de Parkin chez les souris jeunes (7 mois) et âgées (22 mois).

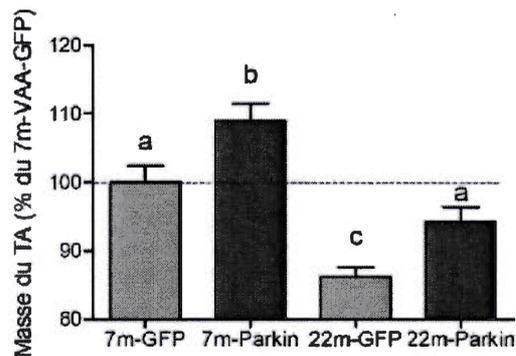


Figure 3.3.2 : Comparaison du poids des muscles TA des souris jeunes et âgées proportionnellement aux poids des muscles TA-GFP des souris jeunes

Légende : Ratio du poids des muscles TA des souris jeunes et âgées sur le poids des muscles TA-GFP des souris jeunes. Deux lettres différentes représentent une différence significative entre les valeurs présentées dans les histogrammes. L'analyse statistique a été effectuée par un test Student unilatéral pour échantillons appariés chez les souris jeunes et les souris âgées. Un test Student unilatéral pour échantillons non appariés a été réalisé lors de la comparaison des muscles TA-GFP entre les souris jeunes et âgées. Les valeurs de p inférieures à 0,05 sont considérées significativement différentes.

3.4 Effets du vieillissement et de la surexpression de Parkin sur la surface de section des fibres musculaires

Après avoir observé l'évolution du poids des muscles ayant été injectés, nous avons voulu caractériser la surface de section des fibres musculaires dans les muscles GAS et TA de nos souris jeunes et âgées après surexpression de Parkin. Pour ce faire, nous avons utilisé des marquages immunohistochimiques.

Nos résultats indiquent en premier lieu qu'avec l'âge il y a diminution de la surface de section des fibres, en comparant 7m-GFP à 22m-GFP, confirmation donc de l'établissement de la sarcopénie dans le GAS (Fig. 3.4.1.B et C). Nos résultats indiquent également que la surexpression de Parkin dans le GAS entraîne une augmentation de la taille des fibres chez les souris jeunes et âgées (Fig. 3.4.1.B et D). L'analyse de la surface de section montre également, en comparant les souris jeunes contrôles (7m-GFP) aux souris âgées inoculées avec Parkin (22m-Parkin) que la surexpression de Parkin semble atténuer le phénotype sarcopénique observé avec l'âge (Fig. 3.4.1.E).

Les résultats obtenus dans le TA confirment et renforcent ceux obtenus dans le GAS. En effet, une augmentation significative de la surface de section moyenne des fibres des muscles TA des souris jeunes et âgées avec la surexpression de Parkin (7m-Parkin VS 22m-Parkin) comparativement aux muscles contrôles (7m-GFP et 22m-GFP) (Fig. 3.4.2.B). De plus, en comparant la surface de section des différents types de fibres des muscles TA chez les souris âgées, nous constatons une augmentation de la surface de section des fibres de type IIb dans les muscles surexprimant Parkin (22m-Parkin) comparativement aux muscles contrôles (22m-GFP). Aucun changement pour les autres types de fibres n'a été observé (Fig. 3.4.2.C). Enfin, aucun changement dans la

proportion du type de fibres n'a été relevé dans les muscles TA-Parkin des souris âgées (Fig. 3.4.2.D).

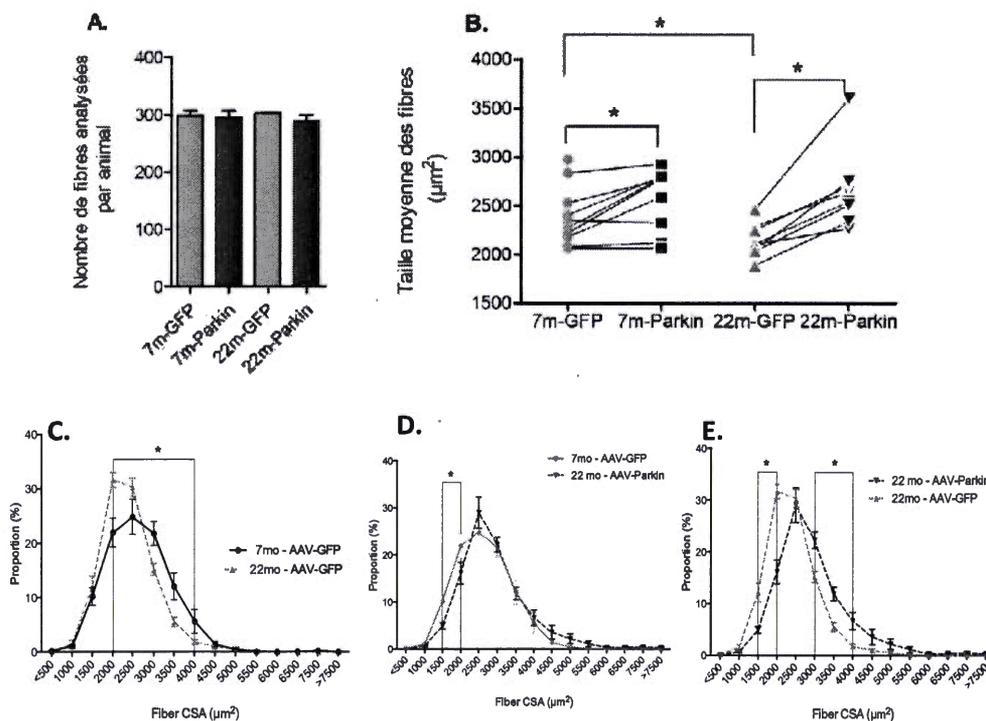


Figure 3.4.1 : Effet de la surexpression de Parkin sur la taille des fibres musculaires dans le GAS de souris jeunes et âgées

Légende : A) Quantification du nombre moyen de fibres analysées dans les muscles GAS par souris, présentée sous forme de moyenne \pm erreurs standard à la moyenne (SEM). B) Quantification de la taille moyenne des fibres des muscles GAS des souris jeunes (n=10) et âgées (n= 8), présentée sous forme de moyenne par animal. L'analyse statistique a été effectuée par un test Student bilatéral pour échantillons appariés chez les souris jeunes et les souris âgées. Les valeurs de p inférieures à 0,05 sont considérées significativement différentes. C, D et E) Quantification de la proportion des fibres des muscles GAS chez les souris jeunes et âgées en fonction de la Surface des Coupes Transversales chez les souris jeunes et âgées. Les analyses statistiques ont été effectuées par analyse de la variance à deux facteurs. Les valeurs de p inférieures à 0,05 sont considérées significativement différentes.

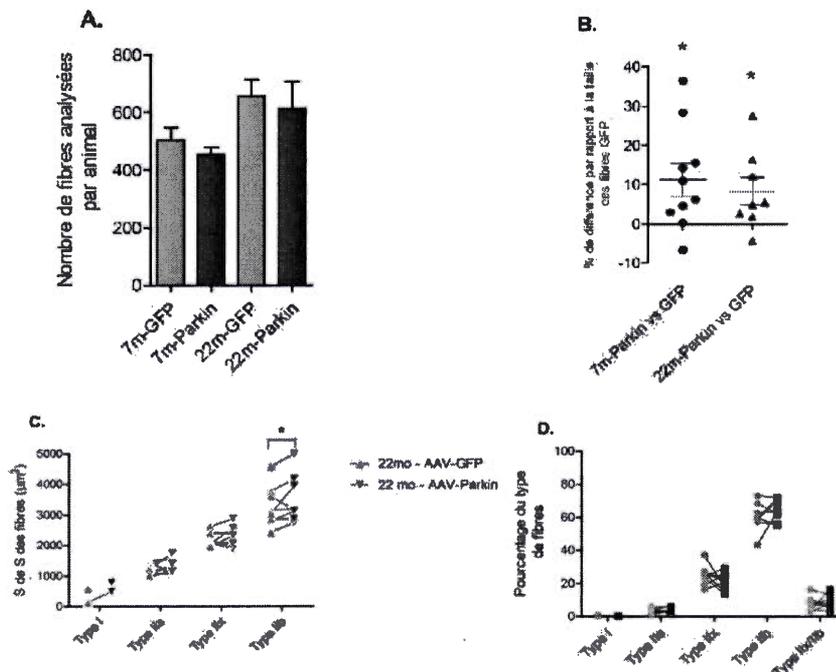


Figure 3.4.2 : Effet de la surexpression de Parkin sur la taille et le type de fibres musculaires dans le TA de souris jeunes et âgées

Légende : A) Quantification du nombre moyen de fibres analysées dans les muscles TA par souris, présentée sous forme de moyenne \pm erreurs standard à la moyenne (SEM). B) Quantification de la taille moyenne des fibres des muscles TA des souris jeunes (n=10) et âgées (n= 8) surexprimant Parkin comparativement à la taille moyenne des fibres des TA contôles. C) Quantification de la Surface de Section (SdS) des fibres des muscles TA de souris âgées (n=8), présentée sous forme de moyenne par animal. D) Quantification de la proportion du type de fibres des muscles TA des souris âgées (n=8), présentée sous forme de moyenne par animal.

3.5 Effets du vieillissement et de la surexpression de Parkin sur un marqueur de la synthèse protéique

Nous avons, par la suite, cherché à évaluer l'implication de la synthèse protéique dans ce gain en masse, en quantifiant le contenu de la fraction pS6/S6. Nos résultats ne montraient aucun changement de la fraction pS6/S6 avec l'âge en comparant les souris jeunes GFP (7m-GFP) aux souris âgées GFP (22m-GFP) (Fig. 3.5). Par contre la surexpression de Parkin entraînait une augmentation du rapport pS6/S6 chez les souris jeunes en comparant 7m-GFP à 7m-Parkin (Fig. 3.5).

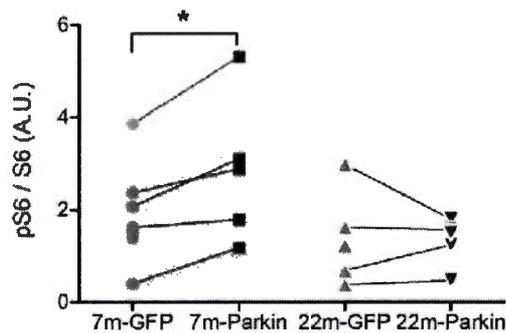


Figure 3.5 : Effet de la surexpression de Parkin sur le contenu en S6 dans le TA de souris jeunes et âgées

Légendes : Quantification de la fraction pS6/S6 en fonction de la surexpression de Parkin dans le TA de souris jeunes (n=10) et âgées (n=8), présentées sous forme de moyenne par animal.

3.6 Effet de la surexpression de Parkin sur l'activité d'enzymes mitochondriales et sur le contenu en mitochondries

Après avoir caractérisé le phénotype musculaire, nous avons cherché à connaître l'effet de la surexpression de Parkin et du vieillissement sur le contenu mitochondrial. Pour ce faire, nous avons d'abord quantifié, par marquage histochimique réalisé *in situ*, l'activité de la Succinate DéHydrogénase (SDH), le complexe II de la chaîne

respiratoire mitochondriale. Par la suite, nous avons également quantifié le contenu en protéine des différents complexes de la chaîne respiratoire et de VDAC (Voltage Dependant Anion Chanel), une protéine de la membrane externe des mitochondries. Nous avons en dernier lieu fait une analyse quantitative par Microscope Électronique à transmission (MET) de la densité mitochondriale.

Nos quantifications par immunobuvardages pour VDAC (Fig. 3.6.1.C) et les complexes de la chaîne respiratoire (Fig. 3.6.1.A) ne montrent aucun changement avec le vieillissement, en comparant 7m-GFP et 22m-GFP. Nous observons cependant, pour VDAC (Fig. 3.6.1.C) et les complexes II et IV de la chaîne respiratoire (Fig. 3.6.1.A) une élévation de leurs contenus avec la surexpression de Parkin chez les souris âgées (22m-Prakin) comparativement aux souris contrôles (22m-GFP). De plus, le contenu en protéines totales de la chaîne respiratoire tend à être augmenté ($p=0,08$) par la surexpression de Parkin dans nos muscles de souris âgées (en comparant 22m-Parkin à 22m-GFP) (Fig. 3.6.1.B). Alors que nous n'avons mis en évidence aucun changement du contenu en protéine de la chaîne respiratoire chez nos souris jeunes (7m-Parkin vs 7m-GFP), nous observons une augmentation de l'activité SDH avec la surexpression de Parkin chez les souris jeunes et âgées (7m-Parkin et 22m-Parkin) comparativement aux muscles des souris contrôles (7m-GFP et 22m-GFP) (Fig. 3.6.2.B).

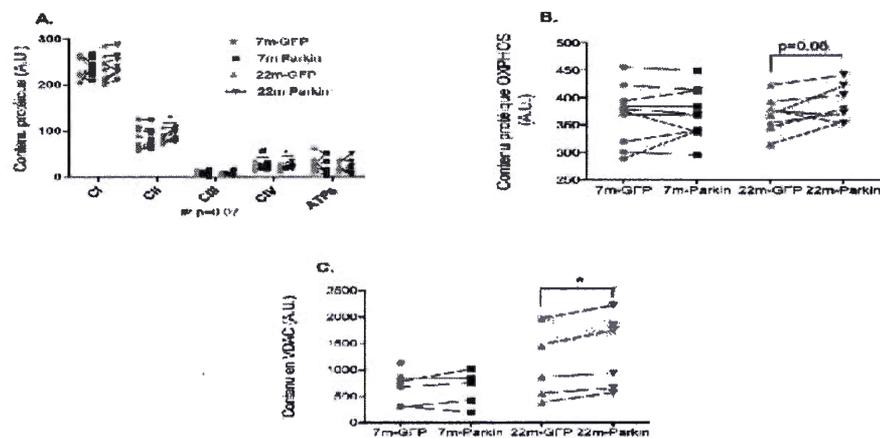


Figure 3.6.1 : Effet de la surexpression de Parkin sur le contenu de sous-unités représentatives des différents complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale dans le muscle de souris jeunes et âgées

Légende : A) Quantification du contenu protéique total de la chaîne respiratoire mitochondriale en fonction de la surexpression de Parkin dans le TA de souris jeunes (n=10) et âgées (n=8), présentée sous forme moyenne par animal. B) Quantification du contenu protéique des différents complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale en fonction de la surexpression de Parkin dans le TA de souris jeunes (n=10) et âgées (n=8), présentée sous forme de moyenne par animal. C) Quantification du contenu protéique en VDAC en fonction de la surexpression de Parkin dans le muscle TA de souris jeunes (n=10) et âgées (n=8), présentée sous forme de moyenne par animal.

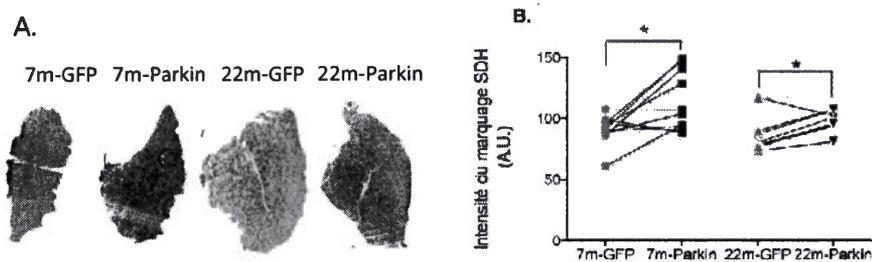


Figure 3.6.2 : La surexpression de Parkin augmente l'activité de la SDH dans le TA des souris jeunes et âgées.

Légende: A) Représentation de la quantification de l'activité SDH par marquage histologique. B) Quantification de l'activité de la SDH dans les muscles TA des souris jeunes et âgées surexprimant ou non Parkin.

Pour ce qui est de la MET, nos résultats montrent une augmentation de la densité et une diminution de la taille des mitochondries dans le muscle squelettique de souris âgées surexprimant Parkin (Fig. 3.6.3.A et B). En comparant les souris 22m-Parkin aux souris 22m-GFP, nous observons une augmentation de 72% de la densité mitochondriale avec la surexpression de Parkin dans le muscle des souris âgées (Fig.

3.6.3.A). Nous observons également, une diminution de la taille des mitochondries avec la surexpression de Parkin dans le muscle des souris âgées (22m-Parkin) comparativement aux souris âgées contrôles (22m-GFP) (Fig. 3.6.3.B).

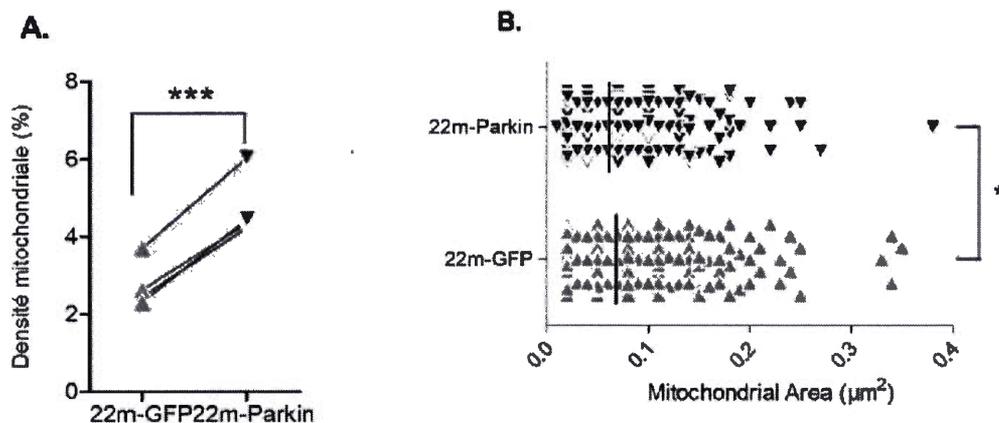


Figure 3.6.3 : Effet de la surexpression de Parkin sur la densité et la surface de coupe mitochondriales dans le muscle squelettique de souris âgées.

Légende : A) Quantification de la densité mitochondriale dans le TA de souris âgées (n=8), présentée sous forme du pourcentage moyen par animal. B) Quantification de la surface mitochondriale.

3.7 Effet de la surexpression de Parkin sur la biogenèse et la dynamique mitochondriale

L'étude de la biogenèse et de la dynamique mitochondriale furent par la suite entreprise. Nous avons, pour se faire, quantifié le contenu en PGC1- α et en TFAM, deux protéines impliquées dans la biogenèse mitochondriale, ainsi qu'en DRP1 et MFN2 des protéines impliquées respectivement dans la fission et dans la fusion des mitochondries. Notre quantification de PGC1- α fut réalisée sur coupe histologique alors que celles de TFAM, DRP1 et de MFN2 furent effectuées par immunobuvardage.

Il est intéressant de noter une tendance ($p=0,09$) à la baisse du contenu en PGC1- α avec le vieillissement (en comparant 7m-GFP à 22m-GFP) (Fig. 3.7.1.B) alors qu'aucun effet du vieillissement n'est observé dans le cas de TFAM (Fig. 3.7.1.C). Toutefois, nos résultats semblent indiquer une augmentation de la biogenèse mitochondriale chez les souris âgées avec la surexpression de Parkin. En effet, nous observons une augmentation significative du contenu in situ en PGC1- α dans le TA des souris âgées ayant été inoculées avec Parkin (22m-Parkin), bien qu'aucun effet ne soit observé chez les souris jeunes malgré la surexpression de Parkin (7m-Parkin), comparativement aux souris contrôles (22m-GFP et 7m-GFP respectivement) (Fig. 3.7.1.B). Nous notons également un contenu en TFAM significativement plus élevé dans les muscles de souris âgées ayant été transduites avec Parkin (22m-Parkin) comparativement aux souris jeunes GFP et Parkin (7m-GFP et 7m-Parkin) (Fig. 3.7.1.C).

Pour ce qui est de la dynamique mitochondriale, nos résultats n'indiquent aucun changement en ce qui concerne le contenu en DRP1, et ce, que ce soit chez les souris jeunes ou âgées (Fig. 3.7.2.A). Dans le cas du contenu en MFN2, nos résultats ne montrent qu'une augmentation significative chez les souris jeunes avec la surexpression de Parkin (7m-Parkin) comparativement aux souris contrôles (7m-GFP), alors qu'aucun changement n'est à noter chez nos souris âgées et ce, quelqu'en soit leur phénotype (Fig. 3.7.2.B). Nous avons également, afin d'étudier la relation entre fusion et fission mitochondriales, calculé le rapport du contenu en MFN2 sur le contenu en DRP1. Nos résultats indiquent une tendance à l'augmentation du rapport MFN2 sur DRP1, donc une augmentation de la fusion comparativement à la fission, chez nos souris jeunes ($p=0,06$) avec la surexpression de Parkin (7m-Parkin vs 7m-GFP (Fig. 3.7.2.C)).

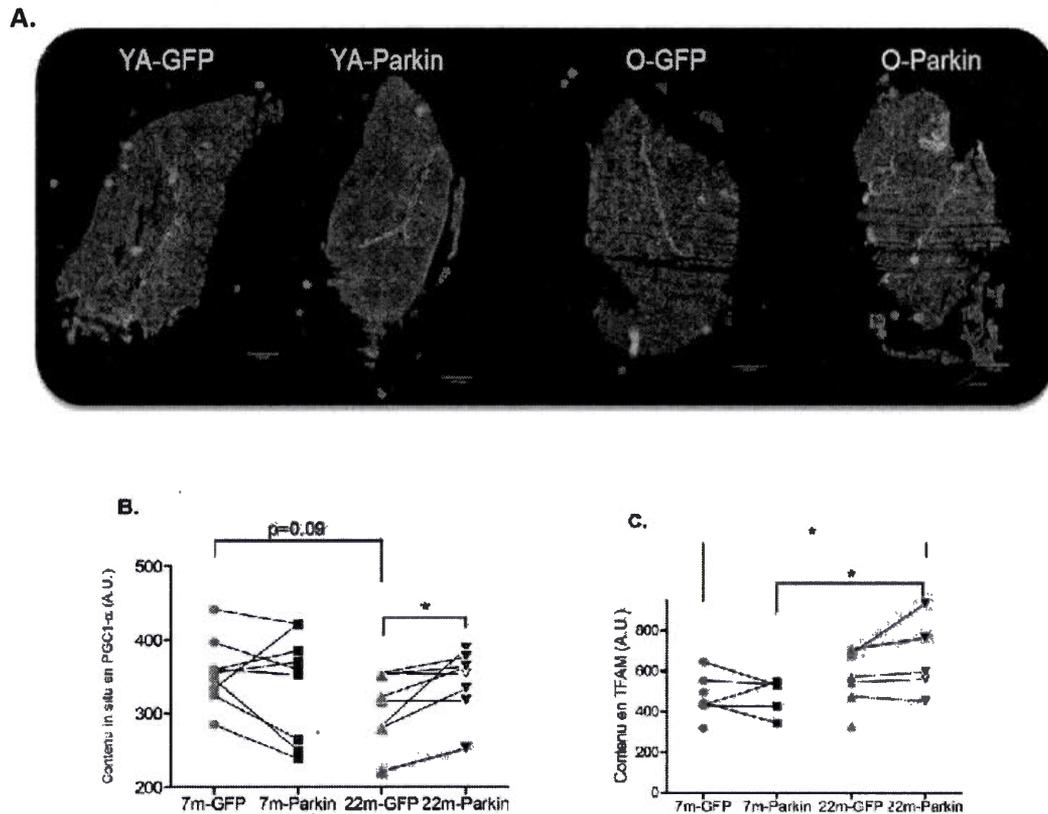


Figure 3.7.1 : Effet de la surexpression de parkin sur la biogenèse mitochondriale dans le muscle de souris jeunes et âgées

Légende : A) Représentation de la quantification du contenu en PGC1- α par immunohistochimie. B) Quantification du contenu *in situ* en PGC1- α en fonction de la surexpression de Parkin dans le TA de souris jeunes (n=10) et âgées (n=8), présentée sous forme de moyenne par animal. C) Quantification du contenu en TFAM en fonction de la surexpression de Parkin dans le TA de souris jeunes (n=10) et âgées (n=8), présentée sous forme de moyenne par animal.

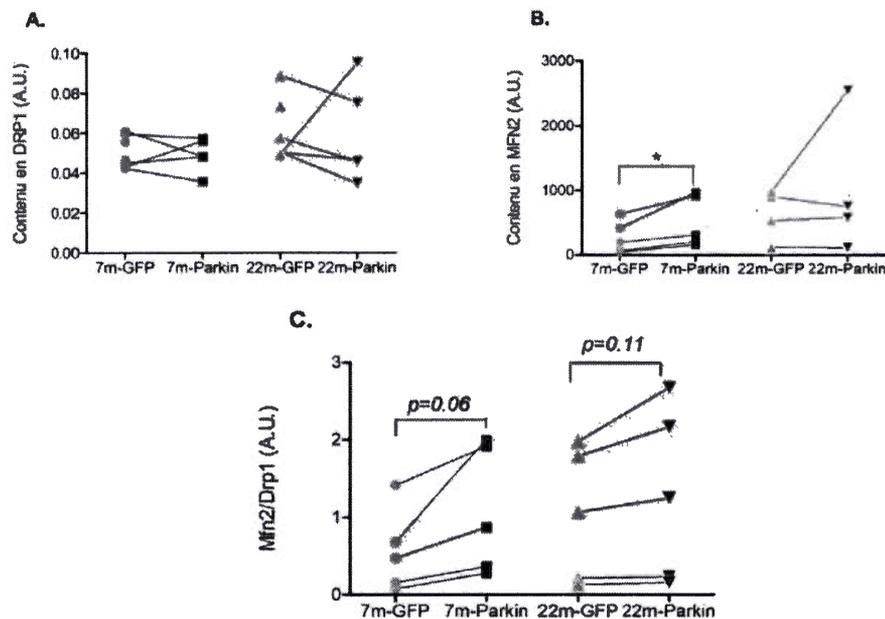


Figure 3.7.2 : Effet de la surexpression de Parkin sur la dynamique mitochondriale dans le muscle de souris jeunes et âgées

Légende : A) Quantification du contenu en DRP1 en fonction de la surexpression de Parkin dans le TA de souris jeunes (n=10) et âgées (n=8), présentée sous forme de moyenne par animal. B) Quantification du contenu en MFN2 en fonction de la surexpression de Parkin dans le TA de souris jeunes et âgées, présentée sous forme de moyenne par animal. C) Quantification de la fraction MFN2/DRP1 en fonction de la surexpression de Parkin dans le TA de souris jeunes (n=10) et âgées (n=8), présentée sous forme de moyenne du rapport contenu en MFN2 sur contenu en DRP1 dans le TA de souris jeunes (n=10) et âgées (n=8).

3.8 Effet de la surexpression de Parkin sur l'autophagie

Parkin étant une protéine important dans l'initiation de l'autophagie, et notamment de la mitophagie, nous avons donc voulu étudier les effets de la surexpression de Parkin sur des marqueurs d'autophagie. Nous avons par conséquent, cherché à quantifier le contenu en p62 et le rapport LC3 activé (LC3II) sur LC3 non activée (LC3I) dans le muscle de souris jeunes et âgées après surexpression de Parkin, LC3 et p62 étant des protéines impliquées dans la formation de l'autophagosome. En comparant nos souris 7m-GFP et 22m-GFP, nos résultats indiquent une augmentation du contenu en p62 avec l'âge, alors qu'aucune différence n'est observée dans le rapport LC3II/LC3I lors du vieillissement (7m-GFP vs 22m-GFP). Étonnamment nous n'avons observé aucun effet de la surexpression de Parkin, que ce soit chez les souris jeunes ou âgées, dans le rapport LC3II/LC3I et dans le contenu en p62 (7m-Parkin vs 7m-GFP et 22m-Parkin vs 22m-GFP (Fig. 3.8.A et B).

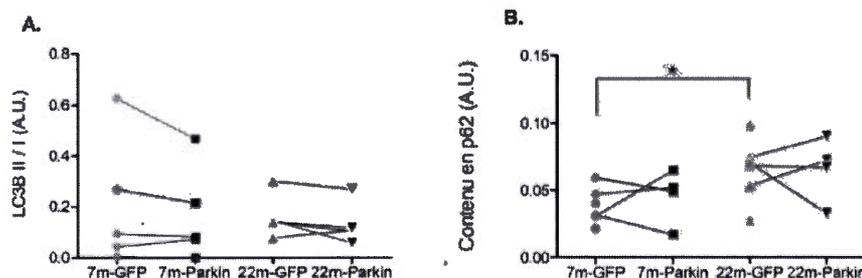


Figure 3.8 : Effet de la surexpression sur la mitophagie dans le muscle squelettique de souris jeunes et âgées lors de la surexpression de Parkin

Légende : A) Quantification de la fraction LC3II/LC3I en fonction de la surexpression de Parkin dans le TA de souris jeunes (n=10) et âgées (n=8), présentée sous forme du rapport moyen par animal. B) Quantification du contenu en p62 dans le TA de souris jeunes (n=10) et âgées (n=8) en fonction de la surexpression de Parkin, présentée sous forme de moyenne par animal.

3.9 Effet de la surexpression de Parkin sur l'apoptose

Un des postulats avancés afin d'expliquer la perte de masse dans le muscle squelettique lors du vieillissement est l'augmentation de l'apoptose. Afin d'étudier l'effet de la surexpression de Parkin sur cette dernière nous avons réalisé un marquage TUNEL ainsi qu'une quantification du contenu protéique en EndoG, une protéique mitochondriale directement impliquée dans le déclenchement de l'apoptose cellulaire. Le marquage TUNEL, quant à lui, nous a permis de quantifier le nombre de noyaux ayant subi un clivage de l'ADN nucléaire, un évènement déclenché par l'initiation de l'apoptose.

Nos résultats indiquent premièrement une augmentation de l'apoptose avec l'âge (Fig. 3.9.A), car en comparant 7m-GFP à 22m-GFP on constate une élévation du nombre de la proportion de noyaux positifs au marquage TUNEL. Ils indiquent deuxièmement, en comparant 7m-Parkin à 7m-GFP et 22m-Parkin à 22m-GFP, une diminution significative du nombre de noyaux dont l'ADN a été clivé avec la surexpression de Parkin chez les souris jeunes et âgées (Fig. 3.9.B). Et en dernier lieu, ils montrent une diminution du contenu en EndoG dans le TA des souris âgées avec la surexpression de Parkin (22m-Parkin comparé à 22m-GFP) (Fig. 3.9.C). Bien que le contenu en EndoG ne varie pas avec la surexpression de Parkin chez nos souris jeunes (7m-Parkin comparé à 7m-GFP) (Fig. 3.9.C), nous pouvons cependant, grâce à ces résultats, avancer une diminution de l'apoptose avec la surexpression de Parkin lors du vieillissement.

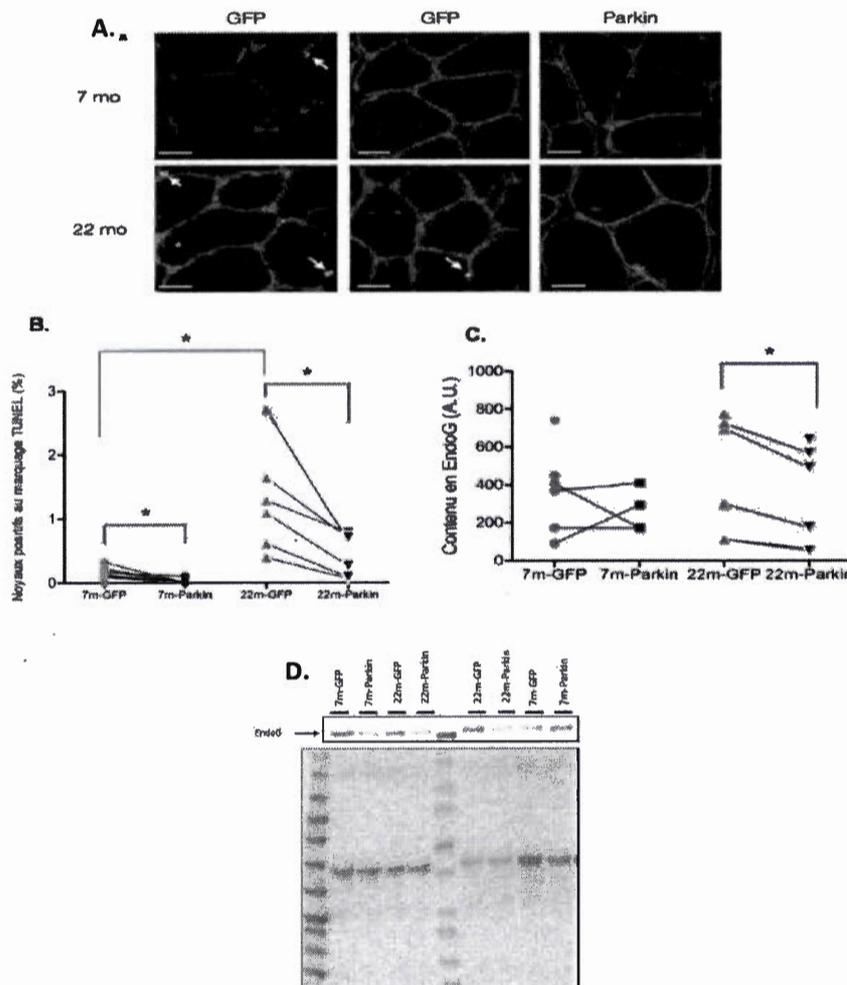


Figure 3.9 : La surexpression de Parkin atténue l'augmentation de l'apoptose observée au cours du vieillissement musculaire.

Légende : A) Représentation de la quantification du nombre de noyaux positifs au marquage TUNEL. B) Quantification du nombre de noyaux positifs au marquage TUNEL (ayant par conséquent subi un clivage de l'ADN nucléaire) après surexpression de Parkin dans le TA de souris jeunes (n=10) et âgées (n=8), présentée sous forme de moyenne par animal. C) Quantification du contenu en EndoG dans le TA de souris jeunes (n=10) et âgées (n=8) lors de la surexpression de Parkin, présentée sous forme de moyenne par animal. D) Immunobuvardage représentatif utilisé pour quantifier le contenu en EndoG (révélation par ECL en haut, marquage par ponceau S en bas).

3.10 Effet de la surexpression de Parkin sur le stress oxydant

Nous avons en dernier lieu cherché à connaître l'effet de la surexpression de Parkin sur le stress oxydant dans les cellules musculaires. Nous avons ainsi réalisé, à cet effet, la quantification du contenu en 4-Hydroxynonanal (4-HNE), un composé utilisé comme marqueur de stress oxydant car résultant de la peroxydation lipidique cellulaire lors de l'augmentation du contenu en composés oxydants. Deux quantifications ont été réalisées, la première par marquage *in situ*, alors que la seconde était faite par immunobuvardage.

Les résultats du marquage *in situ* montrent, en comparant nos souris 7m-GFP à aux souris 22m-GFP, une augmentation avec l'âge du contenu en 4-HNE (Fig. 3.10.B). La surexpression de Parkin chez nos souris 22m-Parkin a permis d'atténuer les effets du vieillissement sur le contenu en 4-HNE (22m-Parkin comparé à 22m-GFP) (Fig. 3.10.B). Nos résultats obtenus par immunobavardage concordent parfaitement avec nos résultats obtenus par immunomarquage (Fig. 3.10.C). Ainsi, nos résultats suggèrent fortement que la surexpression de Parkin permet d'atténuer les stress oxydant survenant au cours du vieillissement.

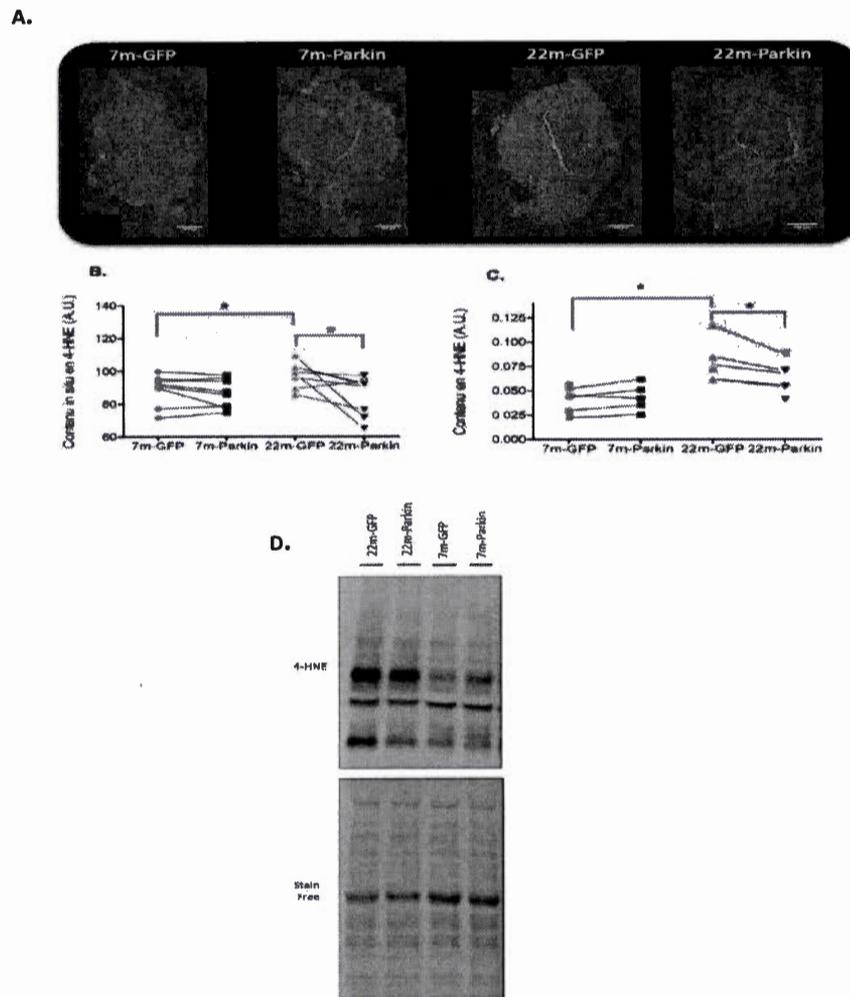


Figure 3.10 : Le stress oxydant est diminué, lors du vieillissement, par la surexpression de Parkin dans le muscle squelettique

Légende : A) Représentation de la quantification du contenu en 4-HNE par marquage immunohistochimique. B) Quantification in situ du contenu en 4-HNE après surexpression de Parkin dans le muscle squelettique de souris jeunes (n=10) et âgées (n=8), sous forme de moyenne par animal. C) Quantification du contenu protéique en 4-HNE après surexpression de Parkin dans le muscle squelettique de souris jeunes (n=10) et âgées (n=8). D) Immunobuvardage représentatif utilisé pour quantifier le contenu en 4-HNE (révélation par ECL en haut, marquage par Stain Free en bas).

CHAPITRE IV

DISCUSSION

Le principal objectif de ce projet de Maitrise était d'établir l'impact, dans le muscle squelettique murin, de la surexpression de Parkin sur le développement de la sarcopénie. Nos résultats principaux démontrent un impact positif de la surexpression de Parkin sur les effets négatifs engendrés par le vieillissement musculaire. En effet, la surexpression de Parkin entraîne une atténuation de la perte de muscle observée avec le vieillissement chez les souris âgées et un gain de masse chez les souris jeunes. Il est important ici de souligner que, de par notre design expérimental, chaque souris était son propre contrôle. De ce fait, les biais reliés aux variations inter-animaux, telle que les variations hormonales, nutritionnelles et d'activité physique, étaient éliminées.

Le recours à l'utilisation d'injection de VAA, technique utilisée depuis les 3 dernières décennies, nous a permis d'induire une élévation substantielle de notre protéine cible dans les muscles injectés sans causer de réponse immunitaire délétère trop élevée. En effet, la figure 3.2 confirme une augmentation du contenu en Parkin dans les muscles injectés avec le VAA exprimant notre protéine cible comparativement aux muscles injectés avec les VAA contrôles. De plus, à l'instar des résultats recueillis par notre groupe de recherche antérieurement (Gouspillou *et al.*, 2014b), nous observons une tendance à la déplétion du contenu en Parkin dans le muscle squelettique avec l'âge. Ce résultat semblerait donc confirmer les données publiées par plusieurs groupes de recherche suggérant un dysfonctionnement de la mitophagie lors du vieillissement musculaire (Carnio *et al.*, 2014, O'Leary *et al.*, 2013, Wohlgemuth *et al.*, 2010). Cependant, une étude plus approfondie ciblant plus spécifiquement le flux mitophagique lors de la surexpression de Parkin serait nécessaire afin de mieux

caractériser les mécanismes impliqués. Notre principale observation fut de constater que dans le muscle sarcopénique la surexpression de Parkin entraînait une atténuation de la perte de masse observée avec le vieillissement. En effet, aucune différence de masse n'est observée entre les souris âgées sur-exprimant Parkin et les souris jeunes contrôles. De plus nos résultats indiquent une augmentation de masse avec la surexpression de Parkin dans les muscles squelettiques jeunes et âgés. Nous observons également, dans les deux muscles étudiés (TA et GAS), une augmentation de la taille moyenne des fibres avec la surexpression de Parkin chez les souris jeunes et âgées. Cependant, les résultats que nous obtenons nous permettent de penser que la surexpression de Parkin entraîne une augmentation de la masse musculaire qui serait réalisée par des voies différentes dans les muscles jeune et âgé. En effet, nos données indiquent que, dans le cas du muscle squelettique jeune, le gain de masse pourrait être dû à l'activation des voies de synthèse protéique, telle que suggéré par une augmentation du rapport pS6 (activée)/S6 (inactive). La protéine kinase S6K, étant activée par mTORC1, phosphoryle S6 en pS6, une des protéines principales impliquées dans l'initiation de l'anabolisme protéique cellulaire (revue dans (Laplante *et al.*, 2012)). De plus, mTORC1 pouvant agir comme régulateur du catabolisme par l'activation de l'autophagie (revue dans (Laplante *et al.*, 2012)), la surexpression de Parkin pourrait accentuer les effets anaboliques de mTORC1 en éliminant ses inhibiteurs. Cependant, dans le muscle âgé, les voies impliquées semblent différentes car les marqueurs de l'activation de la synthèse protéique que nous avons utilisés restent inchangés. Tel qu'il sera discuté plus en détails dans la suite de cette discussion, les effets positifs de la surexpression de Parkin dans les muscles âgés passe très probablement par une diminution de l'apoptose et une réduction du stress oxydant.

Nous avons par la suite voulu caractériser les effets de la surexpression de Parkin sur l'activité de la Succinate DéHydrogénase (SDH) et le contenu mitochondrial. Nos

résultats indiquent une augmentation de l'activité SDH lors de la surexpression de Parkin dans le muscle des souris jeunes et âgées, ce qui suggère une augmentation de l'activité mitochondriale. Dans le cas du contenu mitochondrial, les données obtenues dans le muscle âgé sont indéniables, alors que les données recueillies dans le muscle jeune restent mitigées. En effet, nous n'observons chez les souris jeunes aucun effet de la surexpression de Parkin sur le contenu en protéines totales de la chaîne respiratoire (OXPHOS), et le contenu en VDAC dans le muscle des souris jeunes sur-exprimant Parkin. À l'inverse, dans le muscle âgé des pattes sur-exprimant Parkin, une augmentation du contenu des complexes II et IV est observable comparativement aux muscle âgé GFP. De plus, nos résultats sont fortement appuyés dans le muscle âgé par les données obtenues au MET. Nous constatons, en effet, une augmentation de la densité mitochondriale et une diminution de la surface moyenne mitochondriale dans le muscle squelettique âgé sur-exprimant Parkin, dénotant ainsi, une augmentation du nombre et une diminution de la taille de nos mitochondries.

Tous ces résultats semblent donc indiquer une augmentation de la capacité énergétique des mitochondries lors de la surexpression de Parkin. Chez les souris jeunes, alors qu'aucun changement des contenus en protéines de la phosphorylation oxydative et de VDAC n'a été observé, nous avons mis en évidence que la surexpression de Parkin augmente l'activité de l'enzyme SDH. Chez nos souris âgées, nous avons observé que la surexpression de Parkin, en plus d'augmenter l'activité de la SDH, augmente de 72% le contenu en mitochondries. Notre étude est en parfait accord avec l'augmentation de l'activité d'enzymes mitochondriales observée chez la drosophile lors de la surexpression de Parkin (Rana *et al.*, 2013). De plus, Rana et ses collaborateurs ont eux aussi rapporté que la surexpression de Parkin induit une fragmentation (fission) des mitochondries chez des insectes sur-exprimant Parkin, une observation que nous confirmons dans le présent mémoire.

Afin d'expliquer ces résultats nous avons alors investigué la biogenèse et la dynamique mitochondriales. Pour se faire, nous avons caractérisé le contenu *in situ* de PGC1- α , un des régulateurs principaux de la biogenèse mitochondriale (Lin *et al.*, 2002), et de TFAM, un facteur de transcription impliqué dans la coordination de l'expression des génomes nucléaire et mitochondriaux lors de la biogenèse mitochondriale (Virbasius *et al.*, 1994). Bien que, chez l'humain, les études restent contradictoires sur l'évolution du contenu en PGC1- α avec l'âge (Gouspillou *et al.*, 2014b, Ling *et al.*, 2004), chez les rongeurs il reste associé à un déclin de ce dernier lors du vieillissement (Konopka *et al.*, 2013). Dans notre cas, nous observons une tendance ($p=0,09$) à la baisse avec l'âge. Par contre, la surexpression de Parkin n'entraîne une augmentation du contenu en PGC1- α que chez nos souris âgées. Cette augmentation pourrait donc être à l'origine de l'accroissement des mitochondries observé dans le muscle des souris âgées sur-exprimant Parkin. De plus, cette élévation en PGC1- α pourrait également être une des causes de la prise de masse observée dans le muscle des souris âgées sur-exprimant Parkin, car PGC1- α ou plus précisément pGC1- $\alpha 4$ (une version tronquée de PGC1- α) serait impliquée dans l'hypertrophie musculaire (Ruas *et al.*, 2012, Silvennoinen *et al.*, 2015) en inhibant FoxO3 un des gènes reliés à l'atrophie (Sandri *et al.*, 2006). Pour ce qui est de TFAM, contrairement à l'accumulation qui a été observée lors du vieillissement chez l'Homme (Lezza *et al.*, 2001), nous n'observons aucune différence dans le contenu en TFAM avec l'âge. Toutefois, en comparant le contenu en TFAM des muscles âgés sur-exprimant Parkin à celui des muscles jeunes sur-exprimant ou non Parkin, nous observons que le contenu de ce facteur de transcription est plus élevé dans les muscles âgés surexprimant Parkin que dans les muscles jeunes. Cette élévation concorde avec nos résultats précédents et expliquerait, en accord avec PGC1- α , l'augmentation du nombre de mitochondries observé chez les souris âgées sur-exprimant Parkin.

Agissant en coordination avec la biogenèse, la dynamique (qui consiste en la fusion ou la fission mitochondriales) joue un rôle important dans l'établissement de la structure du réseau mitochondrial cellulaire. Deux des principales protéines impliquées dans ce processus sont Mfn2 (pro fusion) et Drp1 (pro fission). En étudiant le contenu de ces deux protéines, il nous a été possible de caractériser l'évolution de ce réseau dans le temps. En faisant le rapport de ces deux protéines, il est possible de voir si les mitochondries tendent plus vers la fusion ou la fission (Mfn2/Drp1 augmente entraîne fusion, Mfn2/Drp1 diminue entraîne fission). Dans notre cas, le rapport Mfn2/Drp1, tend à montrer une augmentation de la fusion avec la surexpression de Parkin, uniquement chez nos souris jeunes. Cependant, en étudiant séparément le contenu respectif de ces deux protéines, nous n'observons qu'une augmentation du contenu en Mfn2 chez les souris jeunes sur-exprimant Parkin. Dans le cas de nos souris âgées, aucunes différences ne restent observables, et ce même avec la surexpression de Parkin. Il est important ici de souligner qu'aucun consensus ne fait foi dans la littérature en ce qui concerne les effets du vieillissement sur l'expression et les contenus en Drp1 et Mfn2. En effet, certaines études rapportent une baisse de Mfn2 et une augmentation de Drp1 dans le muscle squelettique avec l'âge (Iqbal *et al.*, 2013, Joseph *et al.*, 2012), alors que d'autres ne montrent aucuns changements (Distefano *et al.*, 2017, Leduc-Gaudet *et al.*, 2015) ou alors une élévation des contenus avec l'âge (Koltai *et al.*, 2012). Dans leur étude, Leduc-Gaudet et ses collaborateurs ont rapporté des données indiquant qu'avec le vieillissement, les mitochondries sont plus allongées et plus complexes (Leduc-Gaudet *et al.*, 2015). Ces mêmes auteurs ont suggéré que cette augmentation de la complexité des mitochondries musculaires avec le vieillissement pourraient interférer de façon négative avec la mitophagie car les mitochondries doivent se fragmenter pour être éliminées (Leduc-Gaudet *et al.*, 2015). Dans ce contexte, nos résultats de MET sont particulièrement intéressants. En effet, nos résultats indiquent que la surexpression

Parkin entraîne une fragmentation des mitochondries dans les muscles âgés puisque leurs tailles sont en moyenne inférieure à celles des muscles jeunes. Cette fragmentation induite par la surexpression de Parkin semble ainsi renverser les effets du vieillissement et pourrait faciliter l'élimination des mitochondries dysfonctionnelles. Il est également intéressant de souligner que ces résultats de MET sont en accord avec le lien que l'on connaît entre Parkin et Mfn2. En effet, Parkin se lierait à Mfn2 et l'ubiquitinerait afin d'en assurer l'élimination (Chen *et al.*, 2013) entraînant par conséquent la fragmentation des mitochondries. Par contre, dans le cas des souris jeunes, l'augmentation de Mfn2 observée lors de la surexpression de Parkin suggère la nécessité d'engager d'autres recherches afin de clairement établir le lien entre Parkin et Mfn2.

Afin d'étudier l'impact de la surexpression de Parkin sur l'autophagie, nous avons quantifié les contenus en p62 et le rapport LC3II/LC3I, des protéines impliquées dans la formation de l'autophagosome. Seul p62 montrait une accumulation de son contenu avec l'âge, suggérant ainsi, à l'instar de Baehr et ses collaborateurs qui remarquent aussi une augmentation du contenu en p62, une diminution de l'activité autophagique lors du vieillissement (Baehr *et al.*, 2016). Cependant, dans cette étude, Baehr et son groupe de recherche trouvent également une accumulation de LC3II dans le muscle squelettique âgé alors que nos résultats n'indiquent aucun changement de ce marqueur. Ces deux protéines étant toutes les deux détruites dans l'autophagosome, lors de l'autophagie, une accumulation de ces dernières seraient un signe d'une diminution de l'activité autophagique alors qu'une diminution de leur contenu suggérerait une intensification de cette même activité. Pourtant, dans le cas de p62 et de LC3, qui sont toutes deux des protéines qui reconnaissent les protéines ubiquitinées afin de les amener au phagophore, aucun changement n'est à noter lors de la surexpression de Parkin, et ce, que ce soit chez les souris jeunes ou âgées. La surexpression de Parkin, ayant été réalisée dans notre expérience par injection de

VAA aux semaines une et huit de notre protocole, il est fort possible que lors de nos prélèvements, 4 mois après la première injection, des mécanismes d'adaptation se soient installés et qu'il soit par conséquent difficile de caractériser spécifiquement l'autophagie en n'utilisant que des immunobuvardages qui ne fournissent pas d'information dynamique (i.e. évolution d'un processus dans le temps). Pour cela, il aurait été intéressant de réaliser une étude du flux autophagique, cependant pour des raisons de coûts et de temps il ne nous aura pas été possible d'en faire l'exploration. Il est néanmoins attrayant de noter que, bien qu'une augmentation de l'autophagie ne soit pas sans équivoque de par nos résultats, la surexpression de Parkin, telle que réalisée dans notre protocole, entraîne une baisse de certains mécanismes causalement impliqués dans le vieillissement musculaire, notamment l'apoptose.

À l'instar de nombreuses études (Chabi *et al.*, 2008, Gouspillou *et al.*, 2014b, Leeuwenburgh *et al.*, 2005, Spendiff *et al.*, 2016), nous trouvons une augmentation de l'apoptose avec l'âge. Cette augmentation de l'apoptose avec l'âge est considérée comme un des facteurs principaux de la perte de masse et de fonction musculaires lors du vieillissement. En sur-exprimant Parkin, nous obtenons de manière catégorique une diminution de l'apoptose chez les souris jeunes et âgées. En effet, les muscles sur-exprimant Parkin montrent une diminution du nombre de noyaux positifs au marquage TUNEL, un marqueur fiable d'apoptose. De plus, dans le cas des souris âgées sur-exprimant Parkin, une baisse du contenu en Endonucléase G est à noter suggérant une baisse de l'apoptose contrôlée par les mitochondries. La surexpression de Parkin dans le muscle squelettique murin âgé aurait, en augmentant le contrôle de la qualité mitochondriale (augmentation du nombre et diminution de la taille des mitochondries), limité les mécanismes déclenchant l'apoptose. En effet, nos résultats pourraient être expliqués par une diminution du temps d'ouverture du PTP, un des déclencheurs de l'apoptose lors du vieillissement (Gouspillou *et al.*, 2014b, Picard *et*

al., 2010, Spendiff *et al.*, 2016), avec la surexpression de Parkin. De plus ces données sont appuyées par nos quantifications par immunomarquage et par immunobuvardage du contenu en 4HNE (4-Hydroxynonenal), un marqueur de la peroxydation lipidique due au stress oxydant. En effet, alors que nos résultats indiquent une augmentation du stress oxydant avec l'âge, nous obtenons une diminution de ce dernier chez les souris âgées sur-exprimant Parkin. L'augmentation du stress oxydant pouvant être un déclencheur de l'ouverture du PTP, la surexpression de Parkin, en limitant le stress oxydant, ralentirait l'ouverture du PTP et ainsi retarderait le déclenchement de l'apoptose. Ces deux résultats pourraient, par le fait même, expliquer l'atténuation de la perte de masse observée dans le muscle squelettique des souris âgées sur-exprimant Parkin. En effet, en diminuant l'apoptose dans le muscle, et notamment celle contrôlée par les mitochondries, notre intervention aurait préservé l'intégrité structurale myofibrillaire chez les souris âgées. La baisse du stress oxydant ainsi que de l'apoptose pourrait être une conséquence d'un meilleur contrôle de la qualité mitochondriale musculaire. Des mitochondries plus saines entraîneraient une diminution de la production du stress oxydant et par conséquent une atténuation du déclenchement de l'apoptose.

CHAPITRE V

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Nos résultats démontrent pour la première fois que la surexpression de Parkin dans le muscle âgé atténue la sarcopénie, augmente la biogénèse et la densité des mitochondries, diminue le stress oxydant et atténue l'apoptose. De ce fait, nos résultats suggèrent fortement que Parkin pourrait être une cible thérapeutique efficace pour contrecarrer le développement de la sarcopénie. L'hypertrophie induite par la surexpression de Parkin que nous avons observée chez nos souris jeunes adultes suggère également que cette protéine pourrait être une cible thérapeutique potentielle pour lutter contre de multiples pathologies et conditions induisant une atrophie musculaire (e.g. myopathies, cachexie, alitement, maladie neuromusculaire, etc.). Il est important de souligner ici que le potentiel d'application de nos résultats à l'Homme est élevé puisque les VAA sont utilisés comme vecteur conducteur de gènes depuis les années 90 (Berns *et al.*, 1996) et représentent actuellement une stratégie utilisée dans de nombreuses recherches cliniques réalisées chez l'Homme (Mingozzi *et al.*, 2011). Bien que de nouvelles études soient nécessaires pour confirmer et étendre nos résultats, il est donc tout à fait envisageable que les effets de la surexpression musculaire de Parkin soient testés chez l'homme dans un futur proche. Les augmentations de contenu et d'activité d'enzymes mitochondriales ainsi que l'hypertrophie induite par la surexpression de Parkin que nous avons observées nous laissent penser que ces résultats pourraient avoir des applications dans le domaine sportif. En effet, définir des interventions nutritionnelles permettant d'augmenter l'expression musculaire de Parkin semble être une stratégie intéressante pour améliorer les performances physiques.

À l'instar de nombreuses études, nos résultats indiquent que les mitochondries sont essentielles au bon fonctionnement et à la santé des cellules musculaires. Comme relevé dans notre étude, il semblerait qu'un réseau composé de nombreuses et petites mitochondries puisse être propice à l'homéostasie musculaire. Parkin, une protéine impliquée dans l'autophagie et par extension dans la mitophagie, semble donc jouer un rôle important dans la santé des mitochondries et des cellules musculaires. Bien qu'aucun marqueur de mitophagie ne soit cependant augmenté dans notre étude, nos résultats démontrent clairement les bienfaits de la surexpression de Parkin sur le tissu musculaire. Notre étude, à l'instar de nombreuses autres recherches, tend donc à montrer l'importance cruciale de l'autophagie dans la survie des cellules musculaires lors du vieillissement. Toutefois, les fonctions et cibles de Parkin étant très peu connues à l'heure actuelle, notre protocole aurait pu déclencher des mécanismes autres que ceux uniquement impliqués dans l'autophagie et la mitophagie. De nouvelles études sont donc maintenant nécessaires pour disséquer avec précision les mécanismes moléculaires conférant à la surexpression de Parkin ses effets bénéfiques, ainsi que ses possibles effets toxiques. Ceci pourrait être réalisé en collaborant avec des experts s'intéressant aux mécanismes de phosphorylation et d'ubiquitination mettant en jeu Parkin et PINK1 afin d'essayer de caractériser les cibles et mécanismes d'action de Parkin. De plus, les dysfonctions mitochondriales étant mises en cause dans certaines maladies telle que la myopathie de Duchenne, il serait intéressant de tester les effets de la surexpression de Parkin dans des souris mdx, le modèle animal le plus couramment utilisé pour étudier la myopathie de Duchenne. Cela nous permettrait de définir si Parkin est une cible thérapeutique intéressante pour atténuer les dysfonctions mitochondriales et musculaires observées dans la myopathie de Duchenne. Il serait également intéressant de tester les effets de la surexpression de Parkin sur l'insulino-résistance associée à l'obésité. En effet, de nombreuses données disponibles dans la littérature

suggèrent que des dysfonctions mitochondriales pourraient être impliquées dans le développement de l'insulino-résistance. Une perspective de recherche intéressante pourrait en conséquence consister à définir, sur modèle de rongeur, si la surexpression musculaire de Parkin permet d'atténuer l'insulino-résistance induite par un régime riche en gras et en fructose.

RÉFÉRENCES

- Amara CE, Shankland EG, Jubrias SA, Marcinek DJ, Kushmerick MJ & Conley KE (2007) Mild mitochondrial uncoupling impacts cellular aging in human muscles in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104(3):1057-1062.
- Arcand H & Hebert R (2007) Précis de gériatrie. *Paris: Edition Maloine, Edisem.*
- Baehr LM, West DW, Marcotte G, Marshall AG, De Sousa LG, Baar K & Bodine SC (2016) Age-related deficits in skeletal muscle recovery following disuse are associated with neuromuscular junction instability and ER stress, not impaired protein synthesis. *Aging (Albany NY)* 8(1):127.
- Balagopal P, Rooyackers OE, Adey DB, Ades PA & Nair KS (1997) Effects of aging on in vivo synthesis of skeletal muscle myosin heavy-chain and sarcoplasmic protein in humans. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism* 273(4 36-4):E790-E800.
- Bannur SV, Kulgod SV, Metkar SS, Mahajan SK & Sainis JK (1999) Protein determination by Ponceau S using digital color image analysis of protein spots on nitrocellulose membranes. *Analytical biochemistry* 267(2):382-389.
- Bassey EJ, Fiatarone MA, O'Neill EF, Kelly M, Evans WJ & Lipsitz LA (1992) Leg extensor power and functional performance in very old men and women. *Clinical science* 82(3):321-327.
- Basso E, Fante L, Fowlkes J, Petronilli V, Forte MA & Bernardi P (2005) Properties of the permeability transition pore in mitochondria devoid of Cyclophilin D. *Journal of Biological Chemistry* 280(19):18558-18561.
- Báthori G, Csordás G, Garcia-Perez C, Davies E & Hajnóczky G (2006) Ca²⁺-dependent control of the permeability properties of the mitochondrial outer membrane and voltage-dependent anion-selective channel (VDAC). *Journal of Biological Chemistry* 281(25):17347-17358.
- Baughman JM, Perocchi F, Girgis HS, Plovanich M, Belcher-Timme CA, Sancak Y, Bao XR, Strittmatter L, Goldberger O & Bogorad RL (2011) Integrative genomics identifies MCU as an essential component of the mitochondrial calcium uniporter. *Nature* 476(7360):341-345.
- Bernardi P, Scorrano L, Colonna R, Petronilli V & Di Lisa F (1999) Mitochondria and cell death. *European Journal of Biochemistry* 264(3):687-701.
- Berns K & Giraud C (1996) Biology of adeno-associated virus. *Adeno-Associated Virus (AAV) Vectors in Gene Therapy*, Springer. p 1-23.
- Bohnert N, Chagnon J, Coulombe S, Dion P & Martel L (2015) *Projections démographiques pour le Canada (2013 à 2063), les provinces et les territoires (2013 à 2038): rapport technique sur la méthodologie et les hypothèses.*

- Brand MD (2010) The sites and topology of mitochondrial superoxide production. *Experimental gerontology* 45(7):466-472.
- Brown WF, Strong MJ & Snow R (1988) Methods for estimating numbers of motor units in biceps-brachialis muscles and losses of motor units with aging. *Muscle & nerve* 11(5):423-432.
- Cadenas E & Davies KJ (2000) Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radical Biology and Medicine* 29(3):222-230.
- Capel F, Buffière C, Mirand PP & Mosoni L (2004) Differential variation of mitochondrial H₂O₂ release during aging in oxidative and glycolytic muscles in rats. *Mechanisms of ageing and development* 125(5):367-373.
- Capel F, Rimbert V, Lioger D, Diot A, Rousset P, Mirand PP, Boirie Y, Morio B & Mosoni L (2005) Due to reverse electron transfer, mitochondrial H₂O₂ release increases with age in human vastus lateralis muscle although oxidative capacity is preserved. *Mechanisms of ageing and development* 126(4):505-511.
- Cardasis CA & LaFontaine DM (1987) Aging rat neuromuscular junctions: A morphometric study of cholinesterase-stained whole mounts and ultrastructure. *Muscle & nerve* 10(3):200-213.
- Carnio S, LoVerso F, Baraibar MA, Longa E, Khan MM, Maffei M, Reischl M, Canepari M, Loeffler S & Kern H (2014) Autophagy impairment in muscle induces neuromuscular junction degeneration and precocious aging. *Cell reports* 8(5):1509-1521.
- Chabi B, Ljubicic V, Menzies KJ, Huang JH, Saleem A & Hood DA (2008) Mitochondrial function and apoptotic susceptibility in aging skeletal muscle. *Ageing cell* 7(1):2-12.
- Chen Y & Dorn GW (2013) PINK1-phosphorylated mitofusin 2 is a Parkin receptor for culling damaged mitochondria. *Science* 340(6131):471-475.
- De Stefani D, Raffaello A, Teardo E, Szabò I & Rizzuto R (2011) A forty-kilodalton protein of the inner membrane is the mitochondrial calcium uniporter. *Nature* 476(7360):336-340.
- Delbono O (2011) Expression and regulation of excitation-contraction coupling proteins in aging skeletal muscle. *Current aging science* 4(3):248-259.
- Detmer SA & Chan DC (2007) Functions and dysfunctions of mitochondrial dynamics. *Nature reviews Molecular cell biology* 8(11):870-879.
- Dirks AJ, Hofer T, Marzetti E, Pahor M & Leeuwenburgh C (2006) Mitochondrial DNA mutations, energy metabolism and apoptosis in aging muscle. *Ageing research reviews* 5(2):179-195.
- Distefano G, Standley RA, Dubé JJ, Carnero EA, Ritov VB, Stefanovic-Racic M, Toledo FG, Piva SR, Goodpaster BH & Coen PM (2017) Chronological age does not influence ex-vivo mitochondrial respiration and quality control in skeletal muscle. *The Journals of Gerontology: Series A* 72(4):535-542.

- Drew B, Phaneuf S, Dirks A, Selman C, Gredilla R, Lezza A, Barja G & Leeuwenburgh C (2003) Effects of aging and caloric restriction on mitochondrial energy production in gastrocnemius muscle and heart. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 284(2):R474-R480.
- Dupont-Versteegden EE (2006) Apoptosis in skeletal muscle and its relevance to atrophy. *World journal of gastroenterology* 12(46):7463.
- Ferry M (2002) Âge, composition corporelle et statut nutritionnel. *Age & nutrition* 13(2):106-114.
- Fiatarone MA, Marks EC, Ryan ND, Meredith CN, Lipsitz LA & Evans WJ (1990) High-intensity strength training in nonagenarians: effects on skeletal muscle. *Jama* 263(22):3029-3034.
- Figueiredo PA, Ferreira RM, Appell HJ & Duarte JA (2008) Age-induced morphological, biochemical, and functional alterations in isolated mitochondria from murine skeletal muscle. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences* 63(4):350-359.
- Forbes GB & Reina JC (1970) Adult lean body mass declines with age: some longitudinal observations. *Metabolism* 19(9):653-663.
- Friedman JR & Nunnari J (2014) Mitochondrial form and function. *Nature* 505(7483):335-343.
- Frontera WR, Hughes VA, Lutz KJ & Evans WJ (1991) A cross-sectional study of muscle strength and mass in 45-to 78-yr-old men and women. *Journal of applied physiology* 71(2):644-650.
- Fukagawa NK, Brown M, Sinacore DR & Host HH (1995a) The relationship of strength to function in the older adult. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences* 50(Special Issue):55-59.
- Fukagawa NK, Wolfson L, Judge J, Whipple R & King M (1995b) Strength is a major factor in balance, gait, and the occurrence of falls. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences* 50(Special Issue):64-67.
- Gospillou, Bourdel-Marchasson I, Rouland R, Calmettes G, Franconi J-M, Deschodt-Arsac V & Diollez P (2010) Alteration of mitochondrial oxidative phosphorylation in aged skeletal muscle involves modification of adenine nucleotide translocator. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics* 1797(2):143-151.
- Gospillou, Bourdel-Marchasson I, Rouland R, Calmettes G, Biran M, Deschodt-Arsac V, Miraux S, Thiaudiere E, Pasdois P & Demaille D (2014a) Mitochondrial energetics is impaired in vivo in aged skeletal muscle. *Aging Cell* 13(1):39-48.
- Gospillou, Sgarioto N, Kapchinsky S, Purves-Smith F, Norris B, Pion CH, Barbat-Artigas S, Lemieux F, Taivassalo T & Morais JA (2014b) Increased sensitivity to mitochondrial permeability transition and myonuclear translocation of endonuclease G in

atrophied muscle of physically active older humans. *The FASEB Journal* 28(4):1621-1633.

- Greenlund L & Nair KS (2003) Sarcopenia—consequences, mechanisms, and potential therapies. *Mechanisms of ageing and development* 124(3):287-299.
- Hajnoczky G, Csordás G, Das S, Garcia-Perez C, Saotome M, Roy SS & Yi M (2006) Mitochondrial calcium signalling and cell death: approaches for assessing the role of mitochondrial Ca²⁺ uptake in apoptosis. *Cell calcium* 40(5):553-560.
- Hamacher-Brady A & Brady NR (2016) Mitophagy programs: mechanisms and physiological implications of mitochondrial targeting by autophagy. *Cellular and Molecular Life Sciences* 73(4):775-795.
- Harman D (1955) Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry.
- Harman D (1972) The biologic clock: the mitochondria? *Journal of the American Geriatrics Society* 20(4):145-147.
- Hepple RT (2014) Mitochondrial involvement and impact in aging skeletal muscle. *Frontiers in aging neuroscience* 6.
- Holloszy JO & Larsson L (1995a) Motor units: remodeling in aged animals. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences* 50(Special Issue):91-95.
- Holloszy JO & Roberts SB (1995b) Effects of aging on energy requirements and the control of food intake in men. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences* 50(Special Issue):101-106.
- Horton HR (1994) *Principes de biochimie*. De Boeck université,
- Hou Y, Li S, Wu M, Wei J, Ren Y, Du C, Wu H, Han C, Duan H & Shi Y (2016) Mitochondria-targeted peptide SS-31 attenuates renal injury via an antioxidant effect in diabetic nephropathy. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* 310(6):F547-F559.
- Hu Y, Benedict MA, Wu D, Inohara N & Núñez G (1998) Bcl-XL interacts with Apaf-1 and inhibits Apaf-1-dependent caspase-9 activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95(8):4386-4391.
- Hütter E, Skovbro M, Lener B, Prats C, Rabøl R, Dela F & Jansen-Dürr P (2007) Oxidative stress and mitochondrial impairment can be separated from lipofuscin accumulation in aged human skeletal muscle. *Aging cell* 6(2):245-256.
- Ichimura Y, Kirisako T, Takao T, Satomi Y, Shimonishi Y, Ishihara N, Mizushima N, Tanida I, Kominami E & Ohsumi M (2000) A ubiquitin-like system mediates protein lipidation. *Nature* 408(6811):488-492.
- Iqbal S, Ostojic O, Singh K, Joseph AM & Hood DA (2013) Expression of mitochondrial fission and fusion regulatory proteins in skeletal muscle during chronic use and disuse. *Muscle & nerve* 48(6):963-970.

- Jäger S, Handschin C, Pierre JS- & Spiegelman BM (2007) AMP-activated protein kinase (AMPK) action in skeletal muscle via direct phosphorylation of PGC-1 α . *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104(29):12017-12022.
- Janssen I, Heymsfield SB & Ross R (2002) Low relative skeletal muscle mass (sarcopenia) in older persons is associated with functional impairment and physical disability. *Journal of the American Geriatrics Society* 50(5):889-896.
- Janssen I, Shepard DS, Katzmarzyk PT & Roubenoff R (2004) The healthcare costs of sarcopenia in the United States. *Journal of the American Geriatrics Society* 52(1):80-85.
- Joseph AM, Adihetty PJ, Buford TW, Wohlgemuth SE, Lees HA, Nguyen LMD, Aranda JM, Sandesara BD, Pahor M & Manini TM (2012) The impact of aging on mitochondrial function and biogenesis pathways in skeletal muscle of sedentary high-and low-functioning elderly individuals. *Aging cell* 11(5):801-809.
- Kamada Y, Funakoshi T, Shintani T, Nagano K, Ohsumi M & Ohsumi Y (2000) Tor-mediated induction of autophagy via an Apg1 protein kinase complex. *The Journal of cell biology* 150(6):1507-1513.
- Kerner J, Turkaly PJ, Minkler PE & Hoppel CL (2001) Aging skeletal muscle mitochondria in the rat: decreased uncoupling protein-3 content. *American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism* 281(5):E1054-E1062.
- Kerr JF, Wyllie AH & Currie AR (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British journal of cancer* 26(4):239.
- Kihara A, Noda T, Ishihara N & Ohsumi Y (2001) Two Distinct Vps34 Phosphatidylinositol 3-Kinase Complexes Function in Autophagy and Carboxypeptidase Y Sorting in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of cell biology* 152(3):519-530.
- Kim J-H & Thompson LV (2013) Inactivity, age, and exercise: single-muscle fiber power generation. *Journal of Applied Physiology* 114(1):90-98.
- Klionsky DJ (2005) The molecular machinery of autophagy: unanswered questions. *Journal of cell science* 118(1):7-18.
- Koltai E, Hart N, Taylor AW, Goto S, Ngo JK, Davies KJ & Radak Z (2012) Age-associated declines in mitochondrial biogenesis and protein quality control factors are minimized by exercise training. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 303(2):R127-R134.
- Konopka AR, Suer MK, Wolff CA & Harber MP (2013) Markers of human skeletal muscle mitochondrial biogenesis and quality control: effects of age and aerobic exercise training. *Journals of Gerontology Series A: Biomedical Sciences and Medical Sciences* 69(4):371-378.
- Kovacheva EL, Sinha Hikim AP, Shen R, Sinha I & Sinha-Hikim I (2010) Testosterone supplementation reverses sarcopenia in aging through regulation of myostatin, c-

- Jun NH2-terminal kinase, Notch, and Akt signaling pathways. *Endocrinology* 151(2):628-638.
- Koyano F, Okatsu K, Kosako H, Tamura Y, Go E, Kimura M, Kimura Y, Tsuchiya H, Yoshihara H & Hirokawa T (2014) Ubiquitin is phosphorylated by PINK1 to activate parkin. *Nature*.
- Kumaran S, Panneerselvam KS, Shila S, Sivarajan K & Panneerselvam C (2005) Age-associated deficit of mitochondrial oxidative phosphorylation in skeletal muscle: role of carnitine and lipoic acid. *Molecular and cellular biochemistry* 280(1):83-89.
- Kwong LK & Sohal RS (1998) Substrate and site specificity of hydrogen peroxide generation in mouse mitochondria. *Archives of biochemistry and biophysics* 350(1):118-126.
- Lambert AJ & Brand MD (2004) Inhibitors of the quinone-binding site allow rapid superoxide production from mitochondrial NADH: ubiquinone oxidoreductase (complex I). *Journal of Biological Chemistry* 279(38):39414-39420.
- Lanza IR, Zabielski P, Klaus KA, Morse DM, Heppelmann CJ, Bergen HR, Dasari S, Walrand S, Short KR & Johnson ML (2012) Chronic caloric restriction preserves mitochondrial function in senescence without increasing mitochondrial biogenesis. *Cell metabolism* 16(6):777-788.
- Laplante M & Sabatini DM (2012) mTOR signaling in growth control and disease. *Cell* 149(2):274-293.
- Leduc-Gaudet J-P, Picard M, Pelletier F, Sgarioto N, Auger M-J, Vallée J, Robitaille R, St-Pierre DH & Gouspillou G (2015) Mitochondrial morphology is altered in atrophied skeletal muscle of aged mice. *Oncotarget* 6(20):17923-17937.
- Leeuwenburgh C, Gurley CM, Strotman BA & Dupont-Versteegden EE (2005) Age-related differences in apoptosis with disuse atrophy in soleus muscle. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 288(5):R1288-R1296.
- Levine B & Kroemer G (2008) Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell* 132(1):27-42.
- Lexell J, Taylor CC & Sjöström M (1988) What is the cause of the ageing atrophy?: Total number, size and proportion of different fiber types studied in whole vastus lateralis muscle from 15-to 83-year-old men. *Journal of the neurological sciences* 84(2):275-294.
- Lezza A, Pesce V, Cormio A, Fracasso F, Vecchiet J, Felzani G, Cantatore P & Gadaleta MN (2001) Increased expression of mitochondrial transcription factor A and nuclear respiratory factor-1 in skeletal muscle from aged human subjects. *FEBS letters* 501(1):74-78.
- Lin J, Wu H, Tarr PT & Chen-Yu Z (2002) Transcriptional co-activator PGC-1alpha drives the formation of slow-twitch muscle fibres. *Nature* 418(6899):797.

- Lindle R, Metter E, Lynch N, Fleg J, Fozard J, Tobin J, Roy T & Hurley B (1997) Age and gender comparisons of muscle strength in 654 women and men aged 20–93 yr. *Journal of Applied Physiology* 83(5):1581-1587.
- Ling C, Poulsen P, Carlsson E, Ridderstråle M, Almgren P, Wojtaszewski J, Beck-Nielsen H, Groop L & Vaag A (2004) Multiple environmental and genetic factors influence skeletal muscle PGC-1 α and PGC-1 β gene expression in twins. *Journal of Clinical Investigation* 114(10):1518.
- Liu X, Kim CN, Yang J, Jemmerson R & Wang X (1996) Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell* 86(1):147-157.
- Lum JJ, Bauer DE, Kong M, Harris MH, Li C, Lindsten T & Thompson CB (2005) Growth factor regulation of autophagy and cell survival in the absence of apoptosis. *Cell* 120(2):237-248.
- Mammucari C, Milan G, Romanello V, Masiero E, Rudolf R, Del Piccolo P, Burden SJ, Di Lisi R, Sandri C & Zhao J (2007) FoxO3 controls autophagy in skeletal muscle in vivo. *Cell metabolism* 6(6):458-471.
- Manini TM & Clark BC (2011) Dynapenia and aging: an update. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*:glr010.
- Mansouri A, Muller FL, Liu Y, Ng R, Faulkner J, Hamilton M, Richardson A, Huang T-T, Epstein CJ & Van Remmen H (2006) Alterations in mitochondrial function, hydrogen peroxide release and oxidative damage in mouse hind-limb skeletal muscle during aging. *Mechanisms of ageing and development* 127(3):298-306.
- Marcinek DJ, Schenkman KA, Ciesielski WA, Lee D & Conley KE (2005) Reduced mitochondrial coupling in vivo alters cellular energetics in aged mouse skeletal muscle. *The Journal of physiology* 569(2):467-473.
- Masoro EJ (2000) *Challenges of biological aging*. Springer Publishing Company,
- Matsuura A, Tsukada M, Wada Y & Ohsumi Y (1997) Apg1p, a novel protein kinase required for the autophagic process in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* 192(2):245-250.
- Meeusen S, McCaffery JM & Nunnari J (2004) Mitochondrial fusion intermediates revealed in vitro. *Science* 305(5691):1747-1752.
- Mingozzi F & High KA (2011) Therapeutic in vivo gene transfer for genetic disease using AAV: progress and challenges. *Nature reviews genetics* 12(5):341.
- Mizushima N, Noda T, Yoshimori T, Tanaka Y, Ishii T, George MD, Klionsky DJ, Ohsumi M & Ohsumi Y (1998) A protein conjugation system essential for autophagy. *Nature* 395(6700):395-398.
- Morley JE, Baumgartner RN, Roubenoff R, Mayer J & Nair KS (2001) Sarcopenia. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 137(4):231-243.

- Morley JE, Kumar VB, Mattammal MB, Farr S, Morley PM & Flood JF (1996) Inhibition of feeding by a nitric oxide synthase inhibitor: effects of aging. *European Journal of Pharmacology* 311(1):15-19.
- Nakatogawa H, Suzuki K, Kamada Y & Ohsumi Y (2009) Dynamics and diversity in autophagy mechanisms: lessons from yeast. *Nature reviews Molecular cell biology* 10(7):458-467.
- Nicholls DG (2013) *Bioenergetics*. Academic press,
- O'Leary MF, Vainshtein A, Iqbal S, Ostojic O & Hood DA (2013) Adaptive plasticity of autophagic proteins to denervation in aging skeletal muscle. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 304(5):C422-C430.
- Peterson CM, Johannsen DL & Ravussin E (2012) Skeletal muscle mitochondria and aging: a review. *Journal of aging research* 2012.
- Picard M, Ritchie D, Thomas MM, Wright KJ & Hepple RT (2011) Alterations in intrinsic mitochondrial function with aging are fiber type-specific and do not explain differential atrophy between muscles. *Aging cell* 10(6):1047-1055.
- Picard M, Ritchie D, Wright KJ, Romestaing C, Thomas MM, Rowan SL, Taivassalo T & Hepple RT (2010) Mitochondrial functional impairment with aging is exaggerated in isolated mitochondria compared to permeabilized myofibers. *Aging cell* 9(6):1032-1046.
- Porter MM, Vandervoort AA & Lexell J (1995) Aging of human muscle: structure, function and adaptability. *Scandinavian journal of medicine & science in sports* 5(3):129-142.
- Rana A, Rera M & Walker DW (2013) Parkin overexpression during aging reduces proteotoxicity, alters mitochondrial dynamics, and extends lifespan. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110(21):8638-8643.
- Rasmussen UF, Krstrup P, Kjaer M & Rasmussen HN (2003) Human skeletal muscle mitochondrial metabolism in youth and senescence: no signs of functional changes in ATP formation and mitochondrial oxidative capacity. *Pflügers Archiv* 446(2):270-278.
- Reid KF & Fielding RA (2012) Skeletal muscle power: a critical determinant of physical functioning in older adults. *Exercise and sport sciences reviews* 40(1):4.
- Rosenberg IH (1997) Sarcopenia: origins and clinical relevance. *The Journal of nutrition* 127(5):990S-991S.
- Ross JM, Stewart JB, Hagström E, Brené S, Mourier A, Coppotelli G, Freyer C, Lagouge M, Hoffer BJ & Olson L (2013) Germline mitochondrial DNA mutations aggravate ageing and can impair brain development. *Nature* 501(7467):412-415.
- Ruas JL, White JP, Rao RR, Kleiner S, Brannan KT, Harrison BC, Greene NP, Wu J, Estall JL & Irving BA (2012) A PGC-1 α isoform induced by resistance training regulates skeletal muscle hypertrophy. *Cell* 151(6):1319-1331.

- Sakellariou GK, Pearson T, Lightfoot AP, Nye GA, Wells N, Giakoumaki II, Griffiths RD, McArdle A & Jackson MJ (2016) Long-term administration of the mitochondria-targeted antioxidant mitoquinone mesylate fails to attenuate age-related oxidative damage or rescue the loss of muscle mass and function associated with aging of skeletal muscle. *The FASEB Journal*:fj. 201600450R.
- Sandri M (2010) Autophagy in skeletal muscle. *FEBS letters* 584(7):1411-1416.
- Sandri M, Lin J, Handschin C, Yang W, Arany ZP, Lecker SH, Goldberg AL & Spiegelman BM (2006) PGC-1 α protects skeletal muscle from atrophy by suppressing FoxO3 action and atrophy-specific gene transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103(44):16260-16265.
- Scarabelli CC, McCauley RB, Yuan Z, Di Rezze J, Patel D, Putt J, Raddino R, Allebban Z, Abboud J & Scarabelli GM (2008) Oral administration of amino acidic supplements improves protein and energy profiles in skeletal muscle of aged rats: elongation of functional performance and acceleration of mitochondrial recovery in adenosine triphosphate after exhaustive exertion. *The American journal of cardiology* 101(11):S42-S48.
- Seirafi M, Kozlov G & Gehring K (2015) Parkin structure and function. *FEBS Journal*.
- Shintani T, Suzuki K, Kamada Y, Noda T & Ohsumi Y (2001) Apg2p functions in autophagosome formation on the perivacuolar structure. *Journal of Biological Chemistry* 276(32):30452-30460.
- Short KR, Bigelow ML, Kahl J, Singh R, Coenen-Schimke J, Raghavakaimal S & Nair KS (2005) Decline in skeletal muscle mitochondrial function with aging in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102(15):5618-5623.
- Silvennoinen M, Ahtiainen JP, Hulmi JJ, Pekkala S, Taipale RS, Nindl BC, Laine T, Häkkinen K, Selänne H & Kyröläinen H (2015) PGC-1 isoforms and their target genes are expressed differently in human skeletal muscle following resistance and endurance exercise. *Physiological reports* 3(10):e12563.
- Silvestri E, Schiavo L, Lombardi A & Goglia F (2005) Thyroid hormones as molecular determinants of thermogenesis. *Acta Physiologica Scandinavica* 184(4):265-283.
- Sinha-Hikim I, Sinha-Hikim AP, Parveen M, Shen R, Goswami R, Tran P, Crum A & Norris KC (2013) Long-term supplementation with a cystine-based antioxidant delays loss of muscle mass in aging. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences* 68(7):749-759.
- Spendiff S, Vuda M, Gouspillou G, Aare S, Perez A, Morais JA, Jagoe RT, Filion ME, Glicksman R & Kapchinsky S (2016) Denervation drives mitochondrial dysfunction in skeletal muscle of octogenarians. *The Journal of physiology* 594(24):7361-7379.
- St-Jean-Pelletier F, Pion CH, Leduc-Gaudet JP, Sgaroto N, Zovilé I, Barbat-Artigas S, Reynaud O, Alkaterji F, Lemieux FC & Grenon A (2016) The impact of ageing, physical activity,

and pre-frailty on skeletal muscle phenotype, mitochondrial content, and intramyocellular lipids in men. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle*.

- Sun Y, Vashisht AA, Tchieu J, Wohlschlegel JA & Dreier L (2012) Voltage-dependent anion channels (VDACs) recruit Parkin to defective mitochondria to promote mitochondrial autophagy. *Journal of Biological Chemistry* 287(48):40652-40660.
- Tomlinson B & Irving D (1977) The numbers of limb motor neurons in the human lumbosacral cord throughout life. *Journal of the neurological sciences* 34(2):213-219.
- Tonkonogi M, Fernström M, Walsh B, Ji LL, Rooyackers O, Hammarqvist F, Wernerman J & Sahlin K (2003) Reduced oxidative power but unchanged antioxidative capacity in skeletal muscle from aged humans. *Pflügers Archiv* 446(2):261-269.
- Trounce I, Byrne E & Marzuki S (1989) Decline in skeletal muscle mitochondrial respiratory chain function: possible factor in ageing. *The Lancet* 333(8639):637-639.
- Turrens JF, Alexandre A & Lehninger AL (1985) Ubisemiquinone is the electron donor for superoxide formation by complex III of heart mitochondria. *Archives of biochemistry and biophysics* 237(2):408-414.
- Twig G & Shirihai OS (2011) The interplay between mitochondrial dynamics and mitophagy. *Antioxidants & redox signaling* 14(10):1939-1951.
- Umanskaya A, Santulli G, Xie W, Andersson DC, Reiken SR & Marks AR (2014) Genetically enhancing mitochondrial antioxidant activity improves muscle function in aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111(42):15250-15255.
- Virbasius JV & Scarpulla RC (1994) Activation of the human mitochondrial transcription factor A gene by nuclear respiratory factors: a potential regulatory link between nuclear and mitochondrial gene expression in organelle biogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 91(4):1309-1313.
- Wauer T, Swatek KN, Wagstaff JL, Gladkova C, Pruneda JN, Michel MA, Gersch M, Johnson CM, Freund SM & Komander D (2015) Ubiquitin Ser65 phosphorylation affects ubiquitin structure, chain assembly and hydrolysis. *The EMBO journal* 34(3):307-325.
- Wohlgemuth SE, Seo AY, Marzetti E, Lees HA & Leeuwenburgh C (2010) Skeletal muscle autophagy and apoptosis during aging: effects of calorie restriction and life-long exercise. *Experimental gerontology* 45(2):138-148.
- Wokke J, Jennekens F, Van Den Oord C, Veldman H, Smit L & Leppink G (1990) Morphological changes in the human end plate with age. *Journal of the neurological sciences* 95(3):291-310.
- Wullschleger S, Loewith R & Hall MN (2006) TOR signaling in growth and metabolism. *Cell* 124(3):471-484.

- Yarian CS, Rebrin I & Sohal RS (2005) Aconitase and ATP synthase are targets of malondialdehyde modification and undergo an age-related decrease in activity in mouse heart mitochondria. *Biochemical and biophysical research communications* 330(1):151-156.
- Youle RJ & Narendra DP (2011) Mechanisms of mitophagy. *Nature reviews Molecular cell biology* 12(1):9-14.
- Yuan J, Shaham S, Ledoux S, Ellis HM & Horvitz HR (1993) The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 β -converting enzyme. *Cell* 75(4):641-652.
- Zangarelli A, Chanseaux E, Morio B, Brugère C, Mosoni L, Rousset P, Giraudet C, Patrac V, Gachon P & Boirie Y (2006) Synergistic effects of caloric restriction with maintained protein intake on skeletal muscle performance in 21-month-old rats: a mitochondria-mediated pathway. *The FASEB journal* 20(14):2439-2450.
- Zhao J, Brault JJ, Schild A, Cao P, Sandri M, Schiaffino S, Lecker SH & Goldberg AL (2007) FoxO3 coordinately activates protein degradation by the autophagic/lysosomal and proteasomal pathways in atrophying muscle cells. *Cell metabolism* 6(6):472-483.