

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

ÉTUDE DES EFFETS DU VIEILLISSEMENT ET DE LA RESTRICTION
CALORIQUE SUR LA MORPHOLOGIE ET LA DYNAMIQUE DES
MITOCHONDRIES DES MUSCLES OXYDATIFS ET GLYCOLYTIQUES DE
RATS

MÉMOIRE

PRÉSENTÉ

COMME EXIGENCE PARTIELLE

DE LA MAÎTRISE EN BIOLOGIE

PAR

JULIE FAITG

NOVEMBRE 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.07-2011). 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

Avant toute chose, je tiens à remercier mon directeur le Dr. Gilles Gouspillou pour m'avoir fait confiance durant ces deux ans. C'est grâce à lui que j'ai eu « la piqure » de la recherche et bien évidemment de la mitochondrie. Je remercie également les étudiants du laboratoire. Notamment Jean-Philippe Leduc-Gaudet, « mon maître » ayant supporté mes multiples questions, mes remises en question et pour m'avoir apporté tout ce qu'il pouvait me transmettre, je ne te remercierais jamais assez pour tout ce que tu as fait pour moi. Je citerais également Olivier Reynaud, un début discret, mais une personne à l'écoute, qui m'a apporté beaucoup de sagesse et de rigueur dans ma façon de travailler. Merci pour ton écoute et ton aide. Sans oublier Maude Dulac, que je remercie pour toutes nos discussions, nos prises de tête sur les protocoles, merci d'avoir été là dans les bons et les mauvais moments. Et un message aussi tout particulier à Charlotte Pion, qui a su me remotiver et me redonner confiance en moi et en mon travail, à chaque moment difficile. Mais Charlotte, c'est aussi tous ces moments positifs partagés toutes les deux. Merci pour la personne que tu es et merci d'avoir été là pour moi, de m'avoir soutenu et supporté, je ne t'en remercierais jamais assez. Un merci à mes amis et à ma famille, Qui vont toujours hocher la tête et sourire quand je parlerais de mitochondries alors qu'ils n'y comprendront rien. Un message tout particulier à ma Maman. Tu es un exemple pour moi, tu m'as tant supporté dans ce cursus depuis mon début à Lyon jusqu'ici à Montréal. Tu étais là, sans jamais détourner ton chemin.

Je vous aime tous très fort. Merci à vous.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS.....	ii
TABLE DES MATIÈRES.....	iii
LISTE DES FIGURES	vi
LISTE DES ABBRÉVIATIONS.....	vii
RÉSUMÉ	ix
CHAPITRE I	
INTRODUCTION	1
1.1 Généralités sur le vieillissement	1
1.1.1 Données démographiques	1
1.1.2 Composition corporelle et vieillissement.....	2
1.2 Les Mitochondries	10
1.2.1 Généralités.....	10
1.2.2 La morphologie mitochondriale	11
1.2.3 Dynamique mitochondriale	13
1.2.4 Phosphorylation oxydative	15
1.2.5 Production mitochondriale d'espèces réactives de l'oxygène (RLDO) ..	17
1.3 Les dysfonctions mitochondriales au cours du vieillissement.....	19
1.3.1 Énergétique mitochondriale et vieillissement musculaire.....	20
1.3.2 Production de radicaux libres et vieillissement musculaire	20
1.3.3 Homéostasie calcique et vieillissement.....	22
1.3.4 Mort cellulaire et vieillissement.....	23
1.3.5 Morphologie mitochondriale et vieillissement musculaire	24
1.4 La Restriction Calorique (RC).....	25
1.4.1 La restriction calorique et le vieillissement.....	25
1.4.2 La restriction calorique : effets anti-sarcopéniques.....	26
1.5 Muscles glycolytiques et oxydatifs.....	29
1.5.1 Généralités.....	30
1.5.2 Typologie et fonctions mitochondriales.....	31
1.6 Objectifs et hypothèses.....	32
1.6.1 Énoncé du problème.....	32

1.6.2 Objectifs	33
1.6.3 Hypothèses	33

CHAPITRE II

MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	35
2.1 Animaux et Tissus	35
2.2 Composition de la diète : Restriction Calorique.....	36
2.3 Protocole et sacrifice des animaux	37
2.4 Préparation des muscles.....	38
2.5 Histologie.....	38
2.5.1 Préparation de coupes musculaires pour analyses histologiques	38
2.5.2 Immunomarquage : Étude du phénotype musculaire (taille et proportions des différents types de fibres)	39
2.5.3 Détermination <i>in situ</i> de l'activité de la succinate déshydrogénase (SDH)	40
2.5.4 Détermination de l'expression de protéines impliquées dans la dynamique mitochondriale par Western Blot	40
2.5.5 Détermination de la densité et de la morphologie des mitochondries en Microscopie Electronique par Transmission (MET)	41
2.6 Quantification et analyses statistiques.....	43

CHAPITRE III

EFFECTS OF AGING AND CALORIE RESTRICTION ON THE MORPHOLOGY AND DYNAMICS OF MITOCHONDRIA IN OXIDATIVE AND GLYCOLYTIC MUSCLES OF RATS.....	44
3.1 Abstract.....	46
3.2 Résumé	47
3.3 Introduction	49
3.4 Materials and methods.....	51
3.5 Results	56

3.6 Discussion.....	61
3.7 Conclusions	66
3.8 Acknowledgements	67
3.9 References	68
4.0 Figures legends	73
CHAPITRE IV	
DISCUSSION	87
4.1 Impact du vieillissement et de la restriction calorique sur la masse et le phénotype musculaire au sein de muscles glycolytique et oxydatif	89
4.3 Impact du vieillissement et de la restriction calorique sur la morphologie mitochondriale au sein de muscles glycolytique et oxydatif	92
4.4 Impact du vieillissement et de la restriction calorique sur la dynamique mitochondriale au sein de muscles glycolytique et oxydatif.	94
CHAPITRE V	
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	97
RÉFÉRENCES	99

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1 : Représentation graphique d'une projection du nombre moyen de personnes âgées de 0-19ans et 65+ ans (INSEE, ISQ)	2
Figure 1.2 : Évolution de la composition corporelle en % au cours du vieillissement chez l'Homme (Cohn <i>et al.</i> , 1980)	3
Figure 1.3 : Coupe transversale de la cuisse d'un sujet jeune adulte (24 ans) et d'un sujet âgé (65 ans) par IRM.....	4
Figure 1.4: Relation entre l'âge et (A) la surface de section musculaire et (B) le nombre total de fibres au sein du muscle vaste latéral humain (Lexell <i>et al.</i> , 1988)....	5
Figure 1.5 : La force isométrique et l'âge (Adapté de (Vandervoort, 2002)	6
Figure 1.6 : La sarcopénie : un processus multifactoriel	9
Figure 1.7 : Schéma de la mitochondrie	11
Figure 1.8 : Mitochondries intermyofibrillaires (IMF) et sous-sarcolemmales (SS) au sein du Soléaire.	12
Figure 1.9: Un réseau mitochondrial complexe.....	12
Figure 1.10 : Processus de fission et fusion mitochondriales.....	14
Figure 1.11 : Phosphorylation oxydative	15
Figure 1.12 : Production de radicaux libres dérivés de l'oxygène RLDO au sein de la chaîne de transport des électrons de la mitochondrie (Balaban <i>et al.</i> , 2005).....	18
Figure 1.13 : Production de RLDO mitochondriaux	21
Figure 2.1 : Rats Sprague-Dawley	36
Figure 2.2 : Design expérimental.....	37

LISTE DES ABBRÉVIATIONS

A.

- **ADN** : Acide DésoxyriboNucléique
- **AL** : *Ad libitum*
- **ADP** : Adénosine Di-Phosphate
- **ANT** : Adénine Nucléotide Translocase
- **ATP** : Adénosine Tri-Phosphate

C.

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

D.

- **DRP** : *Dynamin-Related Protein*
- **Drp1** : *Dynamin related protein 1*

E.

- **e⁻** : électrons
- **ETC** : Chaîne de transport des électrons

F.

- **FADH₂** : Flavine adénine dinucléotide réduit
- **Fis1** : Fission 1

G.

- **GAS** : Gastronecrosis
- **GDAP1** : *Ganglioside-induced differentiation-associated protein 1*
- **GTP** : Guanosine Tri-Phosphate

H.

- **H₂O₂** : Péroxyde d'hydrogène
- **H⁺** : protons
- **HRP** : *Horse Radish Peroxydase*

I.

- **IGF-1** : le facteur de croissance semblable à l'insuline-1
- **IMF** : Intermyofibrillaire

M.

- **MET** : Microscopie Électronique à Transmission
- **Mfn** : Mitofusin
- **MHC** : *Myosin Heavy Chain*
- **mTOR** : *mamalian Target Of Rapamicin*

N.

- **NADH** : Nicotinamide Adénine Di-nucléotide réduit
- **NAD⁺** : Nicotinamide Adénine Di-nucléotide oxydé

- **NIH** : *National Institut of Health*
- O.
- **O-AL** : rats âgés *ad libitum*
 - **O-CR** : rats âgés restriction calorique
 - **O₂⁻** : anion superoxyde
 - **OPA1** : *OPtic Atrophy 1*
 - **OXPHOS** : Oxydative Phosphorylation
 - **OMS** : Organisation Mondiale de la Santé
- P.
- **PBS** : Tampon phosphate salin
 - **PCr** : Phosphocréatine
 - **Pi** : Phosphate inorganique
 - **PTPm** : Pore de Transition de Perméabilité mitochondriale
 - **PVDF** : *PolyVinylidene Fluoride*
- R.
- **RC** : Restriction Calorique
 - **RLDO** : Radicaux Libres Dérivés de l'Oxygène
 - **RQRV** : Réseau Québécois de Recherche sur le Vieillissement
- S.
- **SDH** : Succinate Déshydrogénase
 - **SDS-PAGE** : *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*
 - **SOL** : Soléaire
 - **SS** : Sous-sarcolemmales
 - **STE** : Système de Transfert des Electrons
- T.
- **TA** : *Tibialis Anterior*
 - **TBS-T** : *Tris-Buffered Saline + 0,1% Tween 20*
- U.
- **UCP** : protéines découplantes
 - **UQAM** : Université du Québec À Montréal
- W.
- **WG** : Gastrocnémien blanc
- Y.
- **YA-AL** : rats jeunes adultes *ad libitum*

RÉSUMÉ

Le vieillissement musculaire est un processus biologique inévitable caractérisé par une perte de masse et de force musculaire, connu sous le nom de sarcopénie. Un nombre croissant de preuves indique que les dysfonctions mitochondriales sont impliquées dans le développement de cette sarcopénie. La restriction calorique (RC), étudiée pour la première fois en 1935 chez le rat, est présentement l'une des interventions les plus efficaces pour contrecarrer ce processus délétère. Les effets de cette stratégie sur le muscle squelettique seraient médiés par son impact positifs sur les mitochondries. L'hypothèse actuellement avancée pour démontrer les effets protecteurs et "anti-vieillissants" de la RC est que cette dernière améliorerait le fonctionnement des mitochondries. Cependant, de nombreux effets spécifiques de la RC sur la biologie mitochondriale, en particulier dans les muscles squelettiques âgés glycolytiques (rapides) et oxydatifs (lents), restent méconnus. Plus particulièrement, les effets de la RC sur la morphologie des mitochondries lors du vieillissement musculaire. L'objectif de ce projet de recherche est donc de définir si les effets protecteurs de la RC impliquent une atténuation des effets du vieillissement sur la morphologie et la dynamique des mitochondries au sein de deux types de muscles, glycolytique (gastrocnémien blanc, GAS blanc utilisant majoritairement la glycolyse à produit terminal lactate pour ses besoins énergétiques) et oxydatifs (soléaire, SOL, densité mitochondriale importante) de rats. Afin de tester ces hypothèses nous avons utilisé trois groupes de rats : jeunes adultes, âgés et âgés sous RC. Les résultats de cette étude montrent que la RC atténue le rapport du poids total sur poids des muscles, un marqueur de sarcopénie, ainsi que le phénotype musculaire. Avec le vieillissement, le muscle SOL présentait une fragmentation des mitochondries, qui est atténuée en RC. En revanche, le muscle WG présente avec le vieillissement des mitochondries plus larges et plus complexes. La RC n'a un effet anti-vieillessement que très faible, voir inexistant, au sein du GAS blanc âgé. Avec le vieillissement, le muscle SOL présentait seulement une augmentation du contenu en protéine de fission Drp1, alors que les muscles soumis à la RC présentaient une augmentation en Drp1 et en Mfn2 (une protéine de fusion). Les contenus en Drp1, Fis1 (protéines de fission) et Mfn2 étaient plus élevés dans les muscles gastrocnémiens (Gas) âgés. La RC dans le Gas a atténué les effets du vieillissement sur le contenu des protéines régulant la dynamique mitochondriale. En conclusion, nos résultats démontrent que les effets du vieillissement et de la RC sur la morphologie et la dynamique mitochondriale sont complexes et diffèrent en fonction du type de muscle.

Mots clés : Restriction calorique, Vieillessement, Muscle squelettique, Mitochondrie, Sarcopénie

CHAPITRE I

INTRODUCTION

I.1 Généralités sur le vieillissement

1.1.1 Données démographiques

Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), la proportion des personnes âgées de 60 ans, et plus, va doubler entre 2015 et 2050, et passera ainsi de 12 à 22 % de la population mondiale (Fig. 1.1). En accord avec cette projection de l'OMS, le rapport « *Global Health and Aging* » de l'Institut National de la Santé (*National Institut of Health* (NIH), USA), estime que « la population des plus de 65 ans est de 8 % à l'heure actuelle et qu'elle aura doublé d'ici 2050 » (NIH, 2011 ; *Updated: January 22, 2015*) (Fig. 1.1).

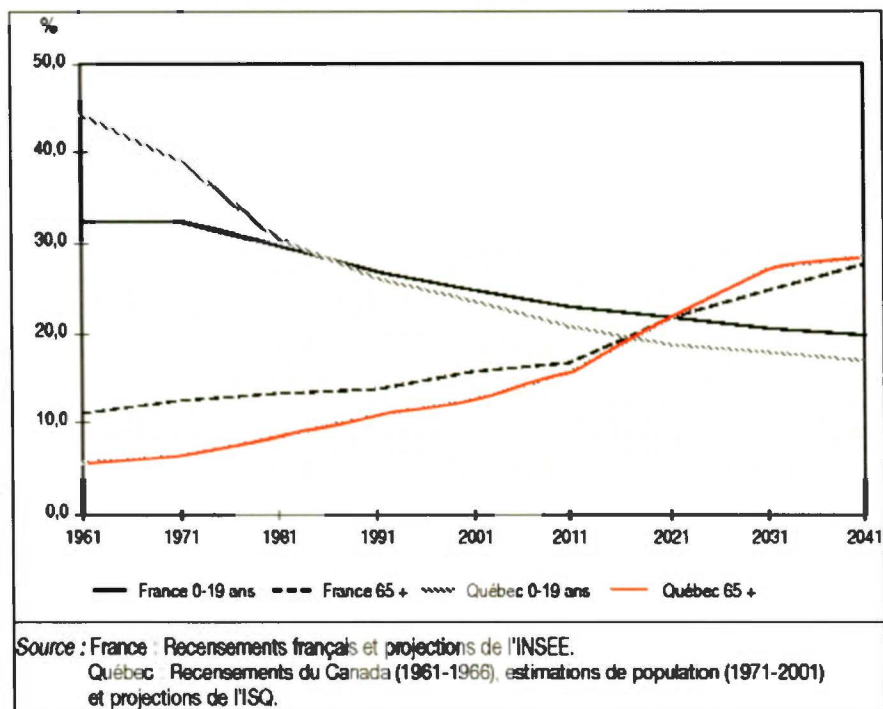


Figure 1.1 : Représentation graphique d'une projection du nombre moyen de personnes âgées de 0-19ans et 65+ ans (INSEE, ISQ)

Légende : Graphique représentant une projection du recensement de la population Française et Québécoise âgée de 0-19ans et de 65 et plus sur 15ans, de 1961 à 2041.

1.1.2 Composition corporelle et vieillissement

Au cours du vieillissement, on assiste à des modifications progressives de la composition corporelle chez l'Homme, en particulier du tissu musculaire et de la masse adipeuse (Fig. 1.2).

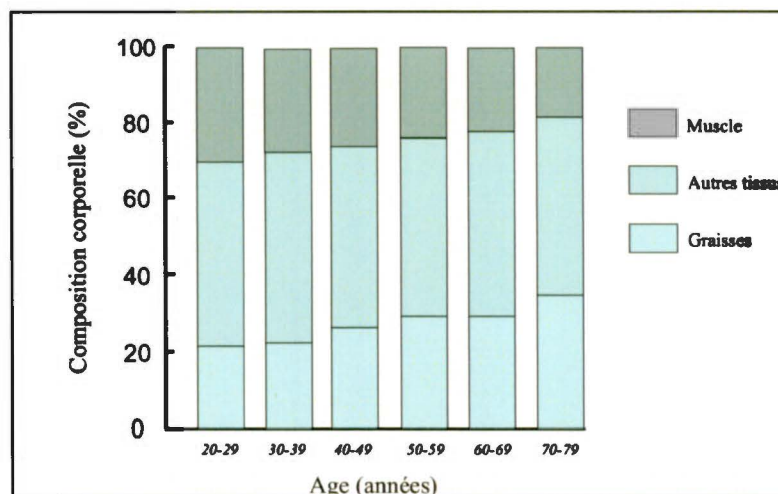


Figure 1.2 : Évolution de la composition corporelle en % des muscles, graisses et autres tissus au cours du vieillissement chez l'Homme (Cohn *et al.*, 1980)

Légende : Graphique représentant la répartition du poids corporelle au fil des années chez l'Homme en pourcentage.

1.1.2.1 Vieillissement et masse adipeuse

Au sein de l'organisme, la masse adipeuse est majoritairement localisée au niveau sous-cutané et intra-abdominal et celle-ci augmente au cours du vieillissement (Fig. 1.2). Ceci résulte d'un déséquilibre entre les apports alimentaires et la dépense énergétique ainsi qu'une moindre aptitude à utiliser les lipides (Kolovou *et al.*, 2014). La masse adipeuse constitué essentiellement de lipide agit soit comme une réserve énergétique pour l'organisme, soit comme une substance protectrice et isolante pour les organes. Leur augmentation résulte de l'accumulation de triglycérides du a un excès de calories et une augmentation trop importante de ces lipides peut mener à l'obésité (Kolovou *et al.*, 2014)

1.1.2.2 Vieillesse, masse maigre et masse musculaire

La masse musculaire représente 50 à 60 % du tissu maigre de l'organisme (Tortora *et al.*, 1994). Au cours du vieillissement, la masse maigre de l'organisme diminue de 10 à 30 % entre 20 et 80 ans (Fig. 1.2) (Janssen *et al.*, 2002). Il est cependant important de noter que l'évolution de la masse maigre au cours du vieillissement n'affecte pas tous les organes de manière similaire. En effet, le tissu musculaire est de loin le plus altéré (Fig. 1.3).

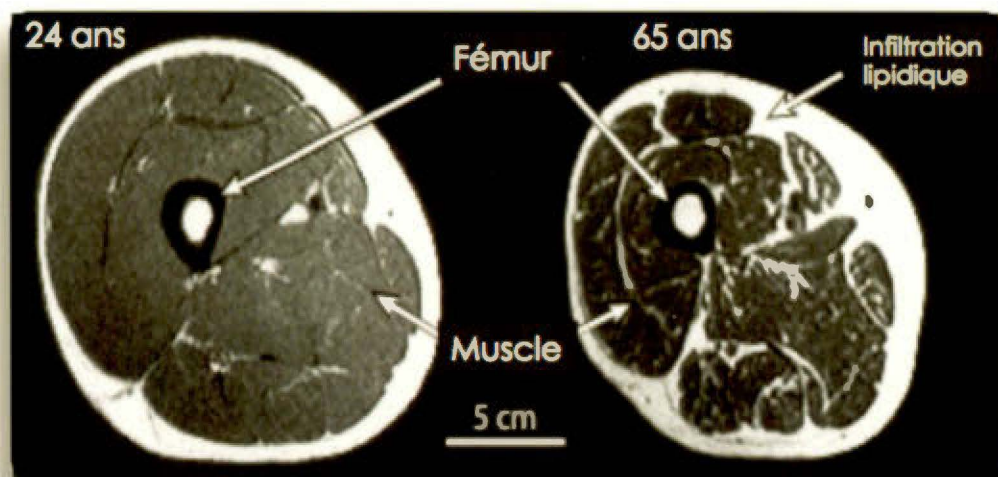


Figure 1.3 : Coupe transversale de la cuisse d'un sujet jeune adulte (24 ans) et d'un sujet âgé (65 ans) par IRM.

Légende : Infiltration de tissu adipeux associée à une réduction progressive de la masse musculaire au cours du vieillissement (Adapté à partir de (Jubrias *et al.*, 1997).

Cette perte de masse musculaire résulte d'une part d'une réduction progressive du nombre de fibres musculaires (Fig. 1.4), et d'autre part d'une réduction de la surface de section des fibres musculaires affectant préférentiellement les fibres de type II (ou fibres glycolytiques) à fort potentiel glycolytique, contenant peu de mitochondries mais présentant une vitesse de contraction élevée (Lexell *et al.*, 1988). En effet, Lexell *et al.* ont permis d'ancrer l'idée que les fibres de type II sont plus susceptibles

aux effets du vieillissement, tandis que le nombre et la surface de section des fibres de type I (fibres à fort potentiel oxydatif contenant beaucoup de mitochondries, mais présentant une vitesse de contraction lente) semblent être relativement bien conservés au cours du vieillissement. Certains parle même d'un *shift* des fibres rapides aux fibres lentes permettant une conservation de ces fibres en type I (Lexell *et al.*, 1988). Cependant, il est important de noter que des données récentes suggèrent que les fibres de type I sont elles aussi affectées surtout lorsque l'atrophie causée par le vieillissement devient très sévère (Purves-Smith *et al.*, 2014; St-Jean-Pelletier *et al.*, 2016).

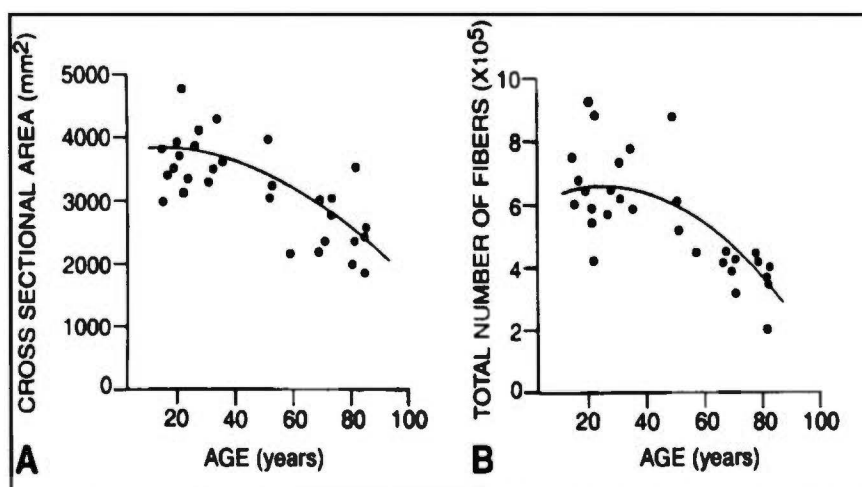


Figure 1.4: Relation entre l'âge et la surface de section musculaire (A) et le nombre total de fibres (B) au sein du muscle vaste latéral humain (Lexell *et al.*, 1988).

Légende : Représentation graphique de la surface de section musculaire et du nombre total de fibres en fonction de l'âge.

1.1.2.3 Vieillissement et force musculaire

À la réduction de masse musculaire survenant au cours du vieillissement s'ajoute logiquement une perte progressive de force musculaire (Fig. 1.5) (Balagopal *et al.*,

1997). Cette perte de force musculaire peut s'avérer problématique, en effet, celle-ci peut gravement nuire à l'autonomie, rendant difficile la réalisation des tâches quotidiennes pour les personnes âgées (Lindle *et al.*, 1997).

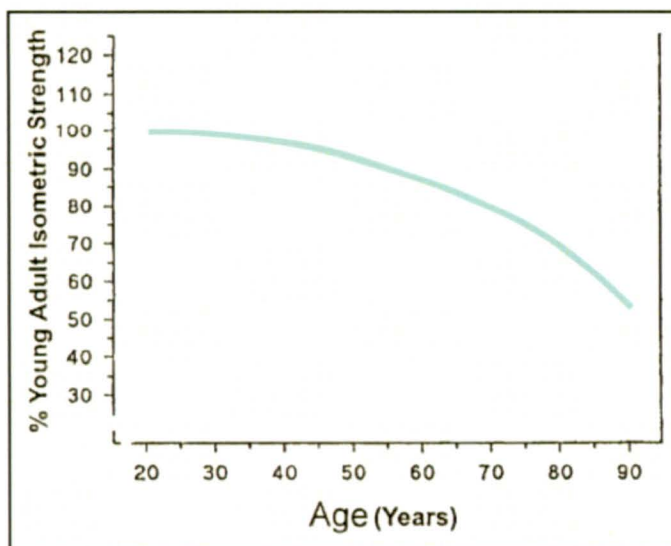


Figure 1.5 : La force isométrique et l'âge (Adapté de (Vandervoort, 2002)

Légende : Représentation graphique de la force isométrique (force volontaire maximum développée sans rapprochement des insertions tendineuses) de jeunes adultes en pourcentage en fonction de l'âge.

1.1.2.4 Vieillessement et qualité musculaire

La perte de force développée chez les sujets âgés n'est pas entièrement expliquée par la perte de masse musculaire. En effet, la force spécifique, c'est-à-dire la force maximale développée normalisée par la surface de section musculaire est réduite de 27 % chez le sujet âgé. Ces résultats indiquent clairement que la qualité de la contraction musculaire est altérée au cours du vieillissement (Bruce *et al.*, 1989).

1.1.2.5 La Sarcopénie

Comme décrit précédemment, le vieillissement est associé à des pertes progressives de masse et de force musculaires, ainsi qu'à un déclin de la qualité de contraction musculaire. Beaucoup de mécanismes interviennent dans la qualité de la contraction musculaire : diminution de l'innervation avec une diminution du nombre de neurones moteurs. La réduction du nombre de neurones moteurs cause une diminution du nombre d'unités motrice (une unité motrice étant constituée d'un motoneurone et de toutes les fibres qu'il innerve). Ainsi toutes les étapes de la contraction sont altérées. Il existe aussi une diminution du nombre de cellules responsable de la régénération musculaire avec le vieillissement, les cellules satellites. L'ensemble de ces altérations musculaires causées par le vieillissement définit la sarcopénie (Fielding *et al.*, 2011; Rosenberg, 1997). D'un point de vue historique, la définition de la sarcopénie n'a pas toujours été celle qui est présentement utilisée. En effet, à l'origine, le terme sarcopénie proposé par Irving Rosenberg en 1989 désignait « *la diminution de la masse musculaire au cours du vieillissement* » (Rosenberg, 1997). Neuf ans plus tard, Rosenberg incorpora l'aspect de fonctionnalité musculaire à sa définition originale (Rosenberg, 1997). Une récente étude de Cerri *et al.*, en 2015 démontre que la sarcopénie touche entre 22 et 44 % des personnes de plus de 65 ans hospitalisées (Cerri *et al.*, 2015). Aujourd'hui, le groupe *The European Working Group on Sarcopenia in Older People* (EWGSOP) considère la sarcopénie comme un véritable « syndrome gériatrique » (Cruz-Jentoft *et al.*, 2010a) car les conditions de vie et les maladies chroniques influencent son développement (Cruz-Jentoft *et al.*, 2010b). Un diagnostic spécifique créé par ce groupe a été mis en place en intégrant ainsi les trois paramètres de la définition actuelle de la sarcopénie : la masse et la force musculaire ainsi que la performance physique (Cruz-Jentoft *et al.*, 2010a). La sarcopénie n'est pas sans conséquence, car elle engendre une perte d'autonomie des personnes, de par une diminution des capacités fonctionnelles comme la marche ainsi qu'en augmentant

les risques de chutes (Janssen *et al.*, 2002; Marzetti *et al.*, 2013; Visser, 2011), de fractures (Morley *et al.*, 2006), d'institutionnalisation et de dépendance entraînant, de ce fait, des coûts de santé reliés au vieillissement très importants (Cruz-Jentoft *et al.*, 2010b). De multiples facteurs peuvent influencer le développement de la sarcopénie (Fig. 1.6). À titre d'exemple, l'inactivité physique (Janssen *et al.*, 2002) et des apports nutritionnels déséquilibrés (Castaneda *et al.*, 1995; Morley *et al.*, 2006) sont fréquemment constatés chez les personnes âgées.

Au niveau cellulaire, plusieurs mécanismes ont été proposés pour expliquer le développement de la sarcopénie (Butler-Browne *et al.*, 2006). Parmi ces mécanismes, plusieurs études ont rapporté que la balance protéique est altérée en raison d'une diminution de la synthèse ou une augmentation de la dégradation protéique chez les sujets âgés entraînant ainsi une atrophie musculaire (Balagopal *et al.*, 1997; Castaneda *et al.*, 1995; Irving *et al.*, 2012; Yarasheski *et al.*, 2002). Au niveau systémique, les modifications hormonales survenant au cours du vieillissement contribuent également très certainement au développement de la sarcopénie. En effet, il a été rapporté que les concentrations circulantes en hormone sexuelle de croissance (GH) (Giustina *et al.*, 2008) et en *Insulin-like Growth Factor - 1* (IGF-1) (Laviola *et al.*, 2007) diminuent au cours du vieillissement. Considérant leurs effets anabolisants, la réduction des concentrations circulantes de ces deux hormones contribue potentiellement au développement de la sarcopénie (Perrini *et al.*, 2010). Avec le vieillissement, on assiste également à une augmentation de la concentration circulante en cytokines pro-inflammatoires (Ferrucci *et al.*, 2005) telles que le facteur de nécrose tumorale (TNF- α), l'interleukine-6 (IL-6) et l'interleukine-1 (IL-1) (Franceschi & Campisi, 2014). Du fait de leurs effet catabolisant dans le muscle, l'augmentation de la concentration plasmatique de ces cytokines contribue très probablement au développement de la sarcopénie (Cree *et al.*, 2004; Jensen, 2008; Schaap *et al.*, 2006). Le développement de la sarcopénie est aussi influencé par des modifications localisées au niveau du système nerveux central, incluant notamment

une réduction du nombre de motoneurones et du diamètre des axones des motoneurones avec l'avancée en âge (Edstrom *et al.*, 2007; Vandervoort, 2002). En plus de ces altérations on retrouve l'accumulation de dysfonctions mitochondriales, des dysfonctions jouant un rôle causal dans le développement de la sarcopénie et sur lequel l'attention sera focalisé dans ce projet. Tel qu'il le sera détaillé de manière critique par la suite, il existe même une théorie mitochondriale du vieillissement qui stipule que la production des radicaux libres par les mitochondries augmenterait avec le vieillissement et causerait une accumulation de dommages oxydatifs (i.e. un stress oxydant) qui pourrait être à l'origine de multiples dysfonctions cellulaires (Harman, 1956; Stadtman, 2004).

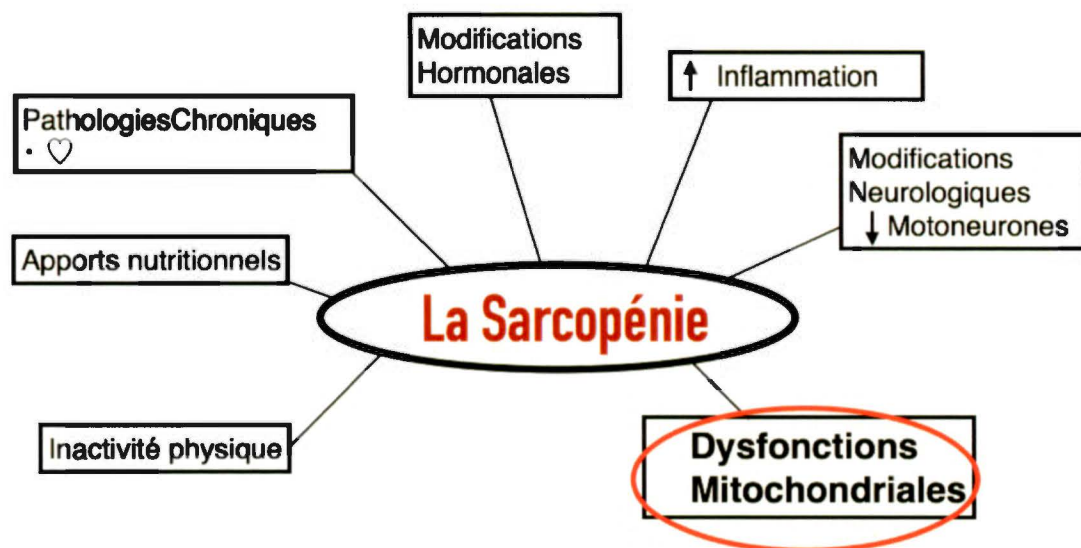


Figure 1.6 : La sarcopénie : un processus multifactoriel

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

1.2 Les Mitochondries

1.2.1 Généralités

Les mitochondries sont des organites intracellulaires cytoplasmiques à double membrane uniquement présents chez les eucaryotes (Margulis, 1975). Elles sont présentes chez tous les types cellulaires excepté les globules rouges. La mitochondrie présente deux membranes distinctes, définissant ainsi deux compartiments : l'espace intermembranaire et la matrice mitochondriale (Fig. 1.7). La membrane interne est sélective, peu perméable au vu de sa composition lipidique particulière (très riche en cardiolipine par exemple) (Iqbal *et al.*, 2013). Cette membrane est repliée et forme des crêtes, permettant une augmentation de la surface membranaire. Ces crêtes contiennent les protéines impliquées dans la phosphorylation oxydative et assurant ainsi la synthèse d'Adénosine Triphosphate (ATP) mitochondrial. La membrane externe est uniforme, continue et semi-perméable aux ions et petites molécules. Elle est constituée de porines permettant le passage de coenzymes réduits. Enfin, c'est au sein de la matrice mitochondriale que l'on retrouve son génome circulaire, l'ADN mitochondrial (ADNmt) (Tortora *et al.*, 1994). Les mitochondries jouent un rôle central dans la production d'énergie nécessaire au fonctionnement cellulaire et sont le siège de la respiration cellulaire. Celle-ci s'effectue dans les mitochondries au travers de la chaîne respiratoire et permet la synthèse d'ATP par l'ATP synthase. En effet, ces organites spécialisés sont le siège de réactions d'oxydoréductions couplées avec la phosphorylation de l'Adénosine Di-Phosphate (ADP) en ATP. Cette chaîne respiratoire représente la principale source de consommation d'oxygène au sein de l'organisme mais aussi de production des radicaux libres dérivés de l'oxygène (RLDO). La synthèse d'ATP est également nécessaire aux différentes biosynthèses, transports membranaires, mouvements cellulaires, etc. Au sein des cellules eucaryotes, les mitochondries sont ainsi considérées comme des « centrales énergétiques ». Les mitochondries sont également impliquées dans de multiples

fonctions comme le cycle de l'urée, le cycle de Krebs, la β -oxydation des acides gras, la régulation de l'homéostasie calcique, la synthèse de l'hème et l'apoptose (Tortora *et al.*, 1994).

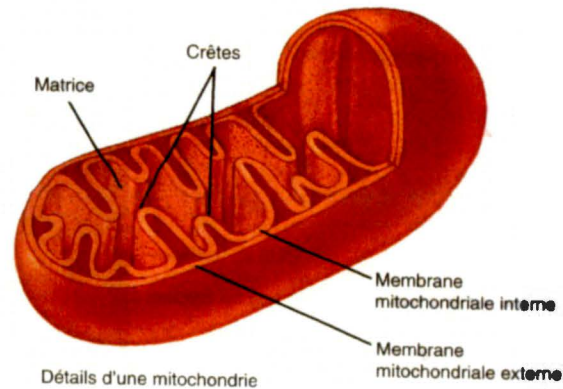


Figure 1.7 : Schéma de la mitochondrie

Légende : Schéma de la structure d'une mitochondrie (Tiré du site internet <http://biofaculte.blogspot.com/2016/09/mitochondrie-definition-et-role.html>)

1.2.2 La morphologie mitochondriale

Au sein du muscle squelettique, il existe deux types de populations de mitochondries : les mitochondries sous-sarcolemmales (SS), localisées sous la membrane cellulaire, et les mitochondries intermyofibrillaires (IMF), localisées entre les myofibrilles (Koves *et al.*, 2005) (Fig. 1.8). Les mitochondries IMF représentent environ 80 % du contenu mitochondrial et participent à la production d'énergie nécessaire au raccourcissement des sarcomères et à la recapture du calcium dans les citernes terminales du réticulum sarcoplasmique, alors que les mitochondries SS ont un rôle dans la production d'énergie pour tous les événements se produisant à la membrane mitochondriale (Romanello & Sandri, 2013).

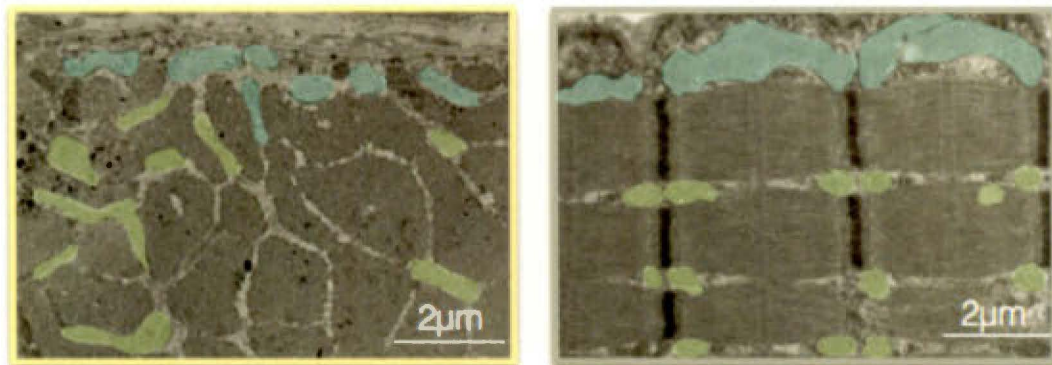


Figure 1.8 : Mitochondries intermyofibrillaires (IMF) et sous-sarcolemmales (SS) au sein du Soléaire.

Légende: Images obtenues en microscopie électronique à transmission de coupes musculaires en orientation transversale (gauche) et longitudinale (droite). SS : Sous-sarcolemmales (bleu) ; IMF : Intermoyofibrillaires (vert) ; Barre d'échelle = 2 μ m

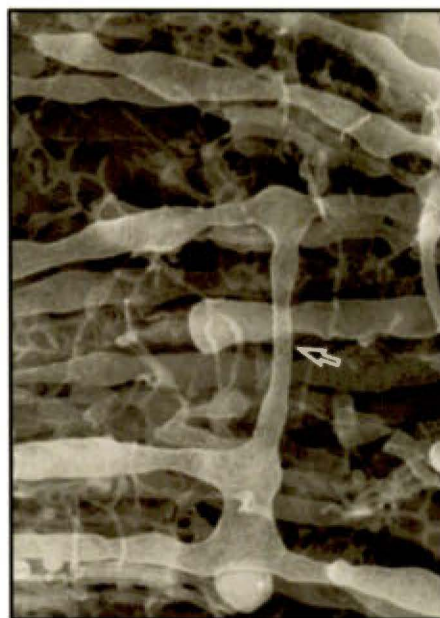


Figure 1.9: Un réseau mitochondrial complexe

Légende : Image soulignant la complexité du réseau mitochondriale au sein du muscle squelettique sous microscopie électronique à balayage. La flèche noire sur cette image pointe vers une mitochondrie dont la morphologie est particulièrement complexe (Ogata & Yamasaki, 1987).

Le nom « mitochondrie » a été attribué à ces organelles en référence à leurs formes et provient du grec *mitos* (filament) et *chondros* (grain). Jusqu'à très récemment, les mitochondries étaient ainsi considérées comme de petites structures en forme de haricot. Nous savons cependant maintenant qu'au sein des cellules, les mitochondries peuvent se présenter sous la forme d'un réseau dynamique, capable de fusionner et fissionner constituant ainsi des structures tubulaires et ramifiées (Fig. 1.9). Elles sont aussi mobiles et changent de morphologie de par des processus de fission et fusion (Ernster & Schatz, 1981; Jakobs, 2006; Picard *et al.*, 2011a; Picard *et al.*, 2013c).

1.2.3 Dynamique mitochondriale

Comme mentionné précédemment, les mitochondries sont capables de changer de morphologie par l'intermédiaire de processus de fusion et de fission. Ces processus jouent un rôle essentiel dans le fonctionnement normal des cellules puisqu'ils sont nécessaire au bon fonctionnement de l'énergétique mitochondriale ainsi qu'au maintien de l'intégrité de l'ADN mitochondrial (Chan, 2006). L'ensemble de ces processus de fusion et de fission définit la dynamique mitochondriale (Horbay & Bilyy, 2016; Suzuki *et al.*, 2003). Plusieurs protéines régulant cette dynamique ont été identifiées (Iqbal *et al.*, 2013) (Fig1.10).

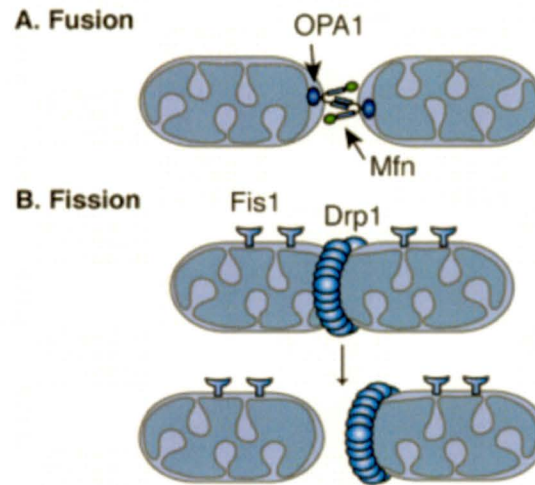


Figure 1.10 : Processus de fission et fusion mitochondriales.

Légende : Schéma représentant les mécanismes de fusions et fissions mitochondriales et leur protéines d'intérêts : **OPA1**, *OPTic Atrophy 1* ; **Mfn**, *Mitofusin* ; **Fis1**, *Fission 1* ; **Drp1**, *Dynamin related protein 1*. La fusion des membranes externes de la mitochondrie est actionnée par Mfn1 et Mfn2, alors que la fusion des membranes internes est réalisée par OPA1. La fission mitochondriale est contrôlée par Fis1 qui recrute Drp1 formant ainsi des complexes en spirales aux sites de fission de la surface externe des mitochondries induisant ainsi la fission mitochondriale. Tiré du site internet (<http://jonlieffmd.com/blog/dynamic-relationship-of-mitochondria-and-neurons>)

La fission mitochondriale est régie par plusieurs protéines dont la protéine Drp1, une protéine localisée dans le cytoplasme. (Smirnova *et al.*, 2001). Pour qu'il y ait fission, Drp1 doit être recrutée sur la membrane externe mitochondriale par Fis 1 formant ainsi des complexes en spirales (Benard *et al.*, 2007a). Cette structure enveloppe la membrane mitochondriale et se contracte aux sites de fission grâce à l'énergie fournie par l'hydrolyse du guanosine triphosphate (GTP). Lorsque la fission est prédominante, les mitochondries adoptent une morphologie fragmentée (Benard *et al.*, 2007a; Shaw & Nunnari, 2002).

La fusion mitochondriale est quant à elle assurée par les protéines Mitofusine 1 et 2 (Mfn1, Mfn2) et *Optic atrophy 1* (OPA1) (Santel & Fuller, 2001). Les protéines Mfn1 et Mfn2 sont des enzymes possédant une activité GTPasique situées sur la membrane externe avec différents motifs permettant leur attachement (Picard *et al.*, 2013b). La protéine OPA1 est située dans l'espace intermembranaire sous formes d'isoformes longs et courts, mais aussi et surtout au niveau des crêtes mitochondriales (Romanello & Sandri, 2015). La fusion mitochondriale de ces membranes internes et externes est coordonnée. Lorsque la fusion est prédominante, le réseau mitochondrial devient filamenteux et ramifié (Cipolat *et al.*, 2004).

1.2.4 Phosphorylation oxydative

Chez les eucaryotes, le processus de conversion du pouvoir réducteur en ATP se trouve dans les mitochondries. Les mitochondries fournissent aux cellules l'énergie dont elles ont besoin pour assurer leur survie et leurs fonctions au travers d'un système dénommé phosphorylation oxydative. La phosphorylation oxydative se compose du Système de Transfert des Electrons (STE, également nommée chaîne respiratoire) et de protéines impliquées dans la phosphorylation de l'ADP en ATP.

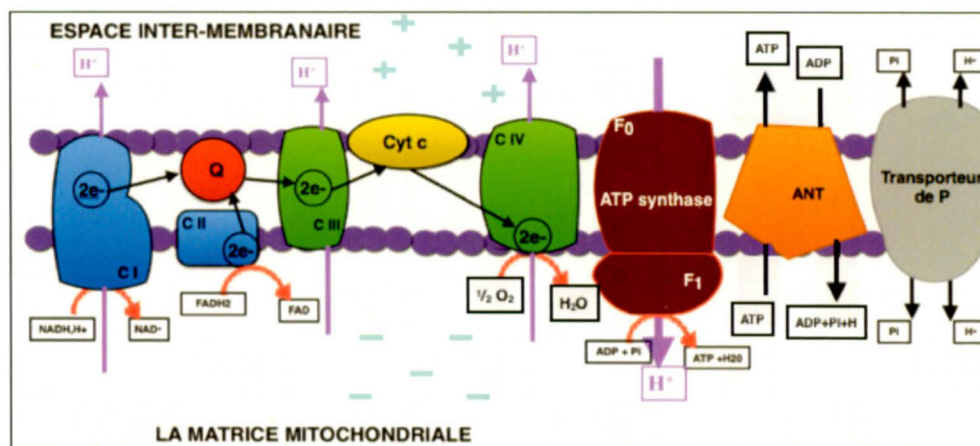


Figure 1.11 : Phosphorylation oxydative

Légende : Schéma illustrant le fonctionnement de la phosphorylation oxydative. **CI**, Complexe I : NADH déshydrogénase; **CII**, Complexe II succinate déshydrogénase; **CIII**, Complexe III, cytochrome c réductase; **Cytc**, cytochrome c ; **CIV**, Complexe IV, Cytochrome c oxydase; **e⁻** électrons; **H⁺**, protons; **Q**, Co-enzyme Q; **NADH**, Nicotinamide Adénine Di-nucléotide réduit; **NAD⁺**, Nicotinamide Adénine Di-nucléotide oxydé; **FADH₂**, Flavine adénine dinucléotide hydroquinone forme; **FAD**, Flavine adénine dinucléotide **ADP**, Adénosine Di-Phosphate; **Pi**, Phosphate inorganique; **ATP**, Adénosine Tri-Phosphate; **ANT**, Adénine Nucléotide Translocase ; **Transporteur de P**, transporteur de phosphate.

Le STE est localisé dans la membrane interne de la mitochondrie et est composé d'une centaine de protéines différentes organisées en quatre complexes hétéro-polymériques (Fig. 1.11). Le complexe I (NADH-Coenzyme Q oxydoréductase) est le plus volumineux et contient un site de liaison au NADH, H⁺. Le complexe I prend en charge les deux électrons du NADH, H⁺ et les transferts à l'ubiquinone (Coenzyme Q) qui est un accepteur mobile d'électrons, lipophile, capable de diffuser au sein de la membrane interne mitochondriale. Le complexe I permet la translocation de quatre protons (H⁺) de la matrice à l'espace intermembranaire (Nicholls *et al.*, 2013). Les complexes I et II (ou succinate déshydrogénase) transfèrent leurs électrons à l'ubiquinone. Celui-ci, une fois réduit, forme l'ubiquinol (UQH₂) et va diffuser dans la membrane vers le complexe III (coenzyme Q-cytochrome C oxydoréductase) où il sera de nouveau oxydé et nommé ubiquinone. Le complexe III accepte les électrons de l'ubiquinol et les transfère au cytochrome C (mobile), ce qui permettra au complexe III de pomper 4H⁺ de la matrice vers l'espace intermembranaire. Le complexe IV ou cytochrome C oxydase, est constitué de coenzymes d'hèmes à atomes de cuivre et de cytochrome. Ce complexe oxyde le cytochrome C qui arrive à ses abords et réduit le dioxygène en eau. L'énergie de cette réaction d'oxydo-réduction permet au complexe IV de pomper 2H⁺ vers l'espace intermembranaire (Nicholls *et al.*, 2013), c'est à cet instant que l'oxygène que nous respirons entre en jeu en récupérant les électrons transmis au complexe IV. La réaction finale catalysée par le complexe IV mène à la réduction d'oxygène en eau (Nicholls *et al.*, 2013). Les

complexes I, III et IV utilisent l'énergie libérée par les transferts d'électrons qu'ils réalisent pour pomper des protons de la matrice mitochondriale vers l'espace intermembranaire. C'est ainsi que se crée un gradient de protons (gradient chimio-osmotique) entre l'espace intermembranaire et la matrice des mitochondries. Les protons qui ont été accumulés dans l'espace intermembranaire retournent dans la matrice en passant par l'ATP synthase, permettant ainsi d'apporter l'énergie nécessaire à la phosphorylation de l'ADP en ATP. Le complexe ATP synthase est formé de deux composantes FO et F1. La partie FO est ancrée à la membrane interne mitochondriale par des segments hydrophobes. Cette partie n'est perméable qu'aux protons (Elston *et al.*, 1998). La partie F1 est constituée de 5 chaînes polypeptidiques disposées alternativement, avec des sites catalytiques et des sites de régulation allostérique pour pouvoir moduler la vitesse de réaction du complexe. Afin d'être en mesure de synthétiser l'ATP nécessaire, il est essentiel d'approvisionner l'ATP synthase en ADP et en Pi (Phosphate Inorganique). Ceci est assuré par deux transporteurs présents au sein de la membrane interne : le transporteur de phosphate et le transporteur des nucléotides adényliques (ANT) réalisant l'échange ADP et ATP (Watt *et al.*, 2010 ; Ferguson *et al.*, 2010).

1.2.5 Production mitochondriale d'espèces réactives de l'oxygène (RLDO)

Le muscle squelettique, de par son contenu élevé en mitochondries, est un lieu de forte consommation d'oxygène. La respiration mitochondriale est une des principales sources d'espèces réactives de l'oxygène (RLDO) (Balaban *et al.*, 2005; Sherer *et al.*, 2002), mais elle en est aussi la première cible.

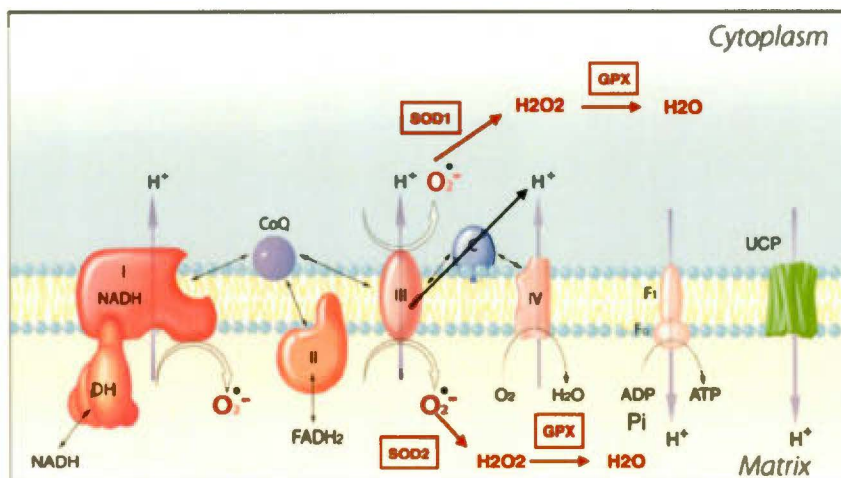


Figure 1.12 : Production de radicaux libres dérivés de l'oxygène RLDO au sein de la chaîne de transport des électrons de la mitochondrie (Balaban *et al.*, 2005).

Légende : Représentation schématique de la chaîne de transport des électrons et de sa production de RLDO. **I**, Complexe I : NADH déshydrogénase; **II**, Complexe II succinate déshydrogénase; **III**, Complexe III, cytochrome c réductase; **Cytc**, cytochrome c; **IV**, Complexe IV, Cytochrome c oxydase; e^- électrons; H^+ , protons; **Q**, Co-enzyme Q; **NADH**, Nicotinamide Adénine Di-nucléotide réduit; **NAD⁺**, Nicotinamide Adénine Di-nucléotide oxydé; **FADH₂**, Flavine adénine dinucléotide hydroquinone forme; **FAD**, Flavine adénine dinucléotide **ADP**, Adénosine Di-Phosphate; **Pi**, Phosphate inorganique; **ATP**, Adénosine Tri-Phosphate; **UCP**, Protéines découplantes; **SOD-1**, Superoxyde dismutase 1; **SOD-2**, Superoxyde dismutase 2; **H₂O₂**, Peroxyde d'hydrogène; **GPX**, Glutathion peroxydase.

La production de RLDO est une conséquence directe du fonctionnement du STE (Fig. 1.12). À différents sites, les électrons transférés dans ces systèmes peuvent en effet réagir avec l'oxygène et générer des RLDO (Fig. 1.11). L'étude de Chen *et al.*, a démontré que les sites majeurs de production de RLDO sont situés au niveau des complexes I et III (Chen *et al.*, 2003). Le radical libre anion superoxyde ($\text{O}_2^{\bullet -}$) est généré principalement aux complexes I et III de la chaîne respiratoire (Balaban *et al.*, 2005; Murphy, 2009). Le complexe III génère des radicaux libres $\text{O}_2^{\bullet -}$ des deux côtés de la membrane interne mitochondriale, où le complexe I les génère uniquement dans la matrice mitochondriale (Fig. 1.12) (Murphy, 2009). Cet anion superoxyde est des précurseur de la formation de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), qui est plus stable mais toujours très toxique (Loschen *et al.*, 1974). Celui-ci catalysés par la superoxyde

dismutase dans l'espace intermembranaire (SOD-2) ou dans la matrice (SOD-1). Le H_2O_2 diffuse ensuite dans le cytoplasme où il est converti en eau par les glutathion peroxydases (Turrens, 2003). Historiquement, les RLDO étaient considérées nocives pour la cellule, mais elles sont maintenant reconnues comme jouant un rôle clé dans les voies de signalisation cellulaire (Finkel, 1998; Rhee *et al.*, 2000; Droge, 2002). Il a été démontré que la signalisation des RLDO était importante pour l'adaptation cellulaire à l'hypoxie (Chandel *et al.*, 1998), la régulation de l'autophagie (Scherz-Shouval *et al.*, 2007), l'immunité (Schmitz *et al.*, 2002; West *et al.*, 2011) et l'apoptose (Pierce *et al.*, 2006). Fait intéressant, il a également été associé à la régulation à la hausse de la biogenèse mitochondriale et à la mitophagie favorisant le remaniement mitochondrial dans le cœur (Bartz *et al.*, 2015). Cependant, les fluctuations des niveaux de ROS ont une incidence sur la signalisation cellulaire et des niveaux excessifs, incapables d'être tamponnés par les systèmes antioxydants des cellules, peuvent endommager les lipides, les protéines et les nucléotides. En fin de compte, les dommages causés par des niveaux excessifs de ROS entraînent la mort cellulaire par nécrose ou apoptose (Sena et Chandel, 2012)

1.3 Les dysfonctions mitochondriales au cours du vieillissement

Comme mentionné précédemment, il existe une théorie mitochondriale du vieillissement qui stipule que la production des radicaux libres par les mitochondries augmenterait avec le vieillissement et causerait une accumulation de dommages oxydatifs à l'origine de multiples dysfonctions mitochondriales et cellulaires (Harman, 1956; Harman, 1972; Stadtman, 2004). Les sections suivantes constituent une revue de la littérature des effets du vieillissement sur différents aspects de la biologie mitochondriale et discutent de manière critique de la théorie mitochondriale proposée par Harman en 1956.

1.3.1 Énergétique mitochondriale et vieillissement musculaire

De multiples études rapportent une diminution de la vitesse de production maximale en ATP par les mitochondries chez le rat (Drew & Leeuwenburgh, 2003; Gouspillou *et al.*, 2014a; Zangarelli *et al.*, 2006), la souris (Mansouri *et al.*, 2006) et l'homme (Clarke *et al.*, 2015; Gouspillou *et al.*, 2010; Porter.C *et al.*, 2015; Short *et al.*, 2005). L'étude de Gouspillou *et al.*, a rapporté qu'en étudiant les fonctions mitochondriales (respiration, émission de RLDO et capacité de rétention du calcium (CRC)) dans les myofibres perméabilisées à partir de biopsies du muscle vaste latéral d'hommes jeunes et âgés actifs en bonne santé que la phosphorylation oxydative musculaire était légèrement découplée chez les hommes âgés actifs (Gouspillou *et al.*, 2014b). Plusieurs études ont également mis en évidence que la vitesse maximale de consommation d'oxygène chez le rat (Gouspillou *et al.*, 2014c; Picard *et al.*, 2010; Picard *et al.*, 2011b) et chez l'Homme (Tonkonogi *et al.*, 2003) est diminuée lors du vieillissement musculaire. Ainsi, la grande majorité des données disponibles dans la littérature indique que l'énergétique mitochondriale est altérée au cours du vieillissement, une conclusion en accord avec la théorie mitochondriale du vieillissement musculaire.

1.3.2 Production de radicaux libres et vieillissement musculaire

Depuis plusieurs années la théorie de Harman est remise en question. Selon cette théorie, la production des radicaux libres par les mitochondries augmenterait avec le vieillissement et causerait une accumulation de dommages oxydatifs à l'origine de multiples dysfonctionnements cellulaires (Harman, 1956). Tel que mentionnée précédemment, la mitochondrie est une des sources principales de RLDO. Normalement, il existe un équilibre entre la production de ces RLDO et les systèmes de défense contre le stress antioxydant.

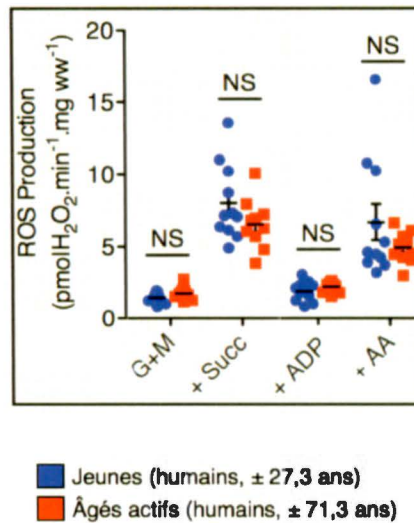


Figure 1.13 : Production de RLDO mitochondriaux

Légende : Représentation graphique démontrant une production de RLDO inchangée dans le muscle squelettique des hommes âgés actifs en bonne santé (Gouspillou *et al.*, 2014b).

Si cet équilibre est altéré, il peut conduire à une augmentation des dommages oxydatifs au sein de la cellule (lipides, ADN, protéines) pouvant ultimement mener à l'apoptose. Plusieurs études se divisent sur le rôle des RLDO au cours du vieillissement : certains ont démontré une augmentation de la production de RLDO et de dommages oxydatifs, au sein de mitochondries vieillissantes (Lee & Wei, 2001), alors que d'autres n'ont rapporté aucune augmentation de la production mitochondriale de RLDO dans des muscles de sujets âgés (Gouspillou *et al.*, 2014b) (Fig. 1.13).

D'après la théorie mitochondriale du vieillissement, augmenter les défenses antioxydantes au niveau mitochondrial ralentirait le vieillissement musculaire. Plusieurs études récentes ont testé cette hypothèse, soit en surexprimant des enzymes

antioxydantes ou en réalisant des suppléments en antioxydants ciblant les mitochondries. Ces études ont rapporté des données très conflictuelles. En effet, Lee *et al.* ont montré chez la souris que la surexpression de la catalase ciblant les mitochondries atténue la production d'H₂O₂ musculaire (~ 45 %) et les dommages oxydatifs mitochondriaux, protège contre la diminution des fonctions mitochondriales musculaires due à l'âge (~ 30 %)(Lee *et al.*, 2010). En opposition à ces résultats, deux études récentes (Sakellariou *et al.*, 2016a; Sakellariou *et al.*, 2016b), utilisant respectivement la mitoquinone mésylate (MitoQ - administrée dans l'eau des souris âgées pendant 15 semaines) et le peptide SS31 (SS31) (une injection sous-cutanée quotidienne de 24 à 28 mois), qui sont deux antioxydants ciblant les mitochondries, n'ont rapporté aucun effet protecteur de ces antioxydants contre le développement de la sarcopénie (Sakellariou *et al.*, 2016a; Sakellariou *et al.*, 2016b). Ces deux études récentes défient donc la théorie de Denham Harman et remettent en cause l'implication des RLDO mitochondriaux dans le développement de la sarcopénie.

1.3.3 Homéostasie calcique et vieillissement

Les mitochondries jouent un rôle important dans l'homéostasie calcique. Le calcium est impliqué dans la régulation de l'activité mitochondriale par l'activation de déshydrogénases du cycle de Krebs, mais aussi dans la modulation de l'ouverture du port de transition de perméabilité mitochondriale (PTPm) (Tortora *et al.*, 1994). Si la concentration calcique est excessive, celle-ci peut augmenter la production de radicaux libres, mais également déclencher l'apoptose par ouverture du port PTPm conduisant à la perméabilisation de la membrane interne mitochondriale, jusqu'à un gonflement de la mitochondrie et à la libération de facteur pro-apoptotiques. Les effets du vieillissement sur la capacité de rétention en calcium (CRC) (marqueur de sensibilité au déclenchement de l'apoptose) ainsi que le temps d'ouverture du PTPm ont été mesurés par notre laboratoire chez l'homme (sujets jeunes vs âgés actifs) à

partir de fibres perméabilisées du muscle vaste latéral (Gouspillou *et al.*, 2014b). Les résultats de cette étude ont démontré que le vieillissement musculaire s'accompagne d'une réduction de cette capacité de rétention en calcium (CRC) de 50% avec l'âge, ce qui indique une sensibilisation du pore de transition PTPm au calcium (Gouspillou *et al.*, 2014b). Cette sensibilisation du PTPm suggère la libération de facteurs pro-apoptotique et donc au déclenchement de l'apoptose contrôlée par les mitochondries (Gouspillou *et al.*, 2014b).

1.3.4 Mort cellulaire et vieillissement

Le dysfonctionnement mitochondrial, l'augmentation de production de RLDO et l'installation d'un stress oxydatif important peuvent mener au déclenchement de la mort cellulaire programmée, un processus nommé apoptose, aboutissant à la fragmentation de l'ADN (Duvall & Wyllie, 1986; Kerr *et al.*, 1972). L'apoptose est considérée comme un mécanisme jouant un rôle important dans le développement de la sarcopénie (Marzetti & Leeuwenburgh, 2006). Dans de telles conditions la mitochondrie libère du cytochrome C et d'autres facteurs pro-apoptotiques tels que l'endonucléase G (EndoG) par exemple, ce qui aboutit *in fine* à la fragmentation de l'ADN nucléaire. Des études récentes ont rapporté, chez l'animal et chez l'homme, que l'apoptose contrôlée par les mitochondries augmente dans les muscles avec le vieillissement (Gouspillou *et al.*, 2014b; Leeuwenburgh *et al.*, 2005; Marzetti *et al.*, 2008). En effet, Gouspillou *et al.*, ont rapporté une augmentation d'un facteur 3 des noyaux des cellules musculaires positifs pour l'EndoG chez les sujets âgés actifs par rapport aux sujets jeunes adultes (Gouspillou *et al.*, 2014b). Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus sur modèle animal, qui démontraient que les mitochondries musculaires déclenchent l'apoptose au cours du vieillissement (Dirks & Leeuwenburgh, 2002).

Cette augmentation de l'apoptose contrôlée par les mitochondries au cours du vieillissement musculaire constitue sans nul doute un mécanisme causalement impliqué dans le développement de la sarcopénie.

1.3.5 Morphologie mitochondriale et vieillissement musculaire

Une étude de notre laboratoire a permis de mettre en évidence que dans un muscle glycolytique (gastrocnémiens blancs), le vieillissement musculaire est associé à une augmentation de la complexité des mitochondries intermyofibrillaires, et à un élargissement des mitochondries sous-sarcolemmales (Leduc-Gaudet *et al.*, 2015). Nous définissons la complexité mitochondriale par deux facteurs morphologique : le rapport longueur-largeur de la mitochondrie sur un facteur de forme qui détermine les branchements de celle-ci. Ceci est en lien avec la plus grande complexité du réseau mitochondrial qu'ils ont rapporté chez les rats âgés. Leduc Gaudet *et al.*, ont également rapporté que le ratio Mfn2 (protéine de fusion) sur Drp1 (protéine de fission) est augmenté chez les rats âgés, suggérant ainsi une augmentation du processus de fusion mitochondriale au cours du vieillissement dans un muscle glycolytique (Leduc-Gaudet *et al.*, 2015).

Il est important de souligner qu'une morphologie trop complexe peut avoir des effets négatifs sur le fonctionnement des mitochondries. En effet, il a été démontré que l'inhibition spécifique de Drp1 résulte en une hyperfusion des mitochondries associée à une diminution de la synthèse mitochondriale d'ATP (Benard *et al.*, 2007a). Ainsi, les altérations de la dynamique et de la morphologie des mitochondries rapportées par Leduc-Gaudet *et al.*, dans les muscles âgés pourraient contribuer à des dysfonctions mitochondriales au cours du vieillissement et ainsi au développement de la sarcopénie (Leduc-Gaudet *et al.*, 2015).

En conclusion, notre revue de la littérature fait clairement ressortir que le vieillissement des muscles squelettiques est associé à une altération de l'énergétique mitochondriale, une augmentation de l'apoptose contrôlée par les mitochondries et à une altération de la morphologie et de la dynamique des mitochondries.

1.4 La Restriction Calorique

1.4.1 La restriction calorique et le vieillissement

Les effets de la restriction calorique (RC) ont été étudiés chez le rat pour la première fois en 1935 (McCay, 1935). En comparant deux groupes de rats soumis ou non à une diète réduite en calories (RC de 40 %), cette étude fut la première à démontrer que la RC induit une augmentation de longévité (+ 42 %) chez des rats. Plusieurs études ont par la suite confirmé cette observation chez le rat (Hepple *et al.*, 2005; Masoro *et al.*, 1982; Weindruch & Walford, 1982; Weindruch *et al.*, 1986).

Les études des effets de la RC sur d'autres espèces, telles que des nématodes, des vers, la levure, des souris, des poissons, démontrent également une augmentation de la durée de vie (Colman *et al.*, 2009; Fontana *et al.*, 2010; Walford *et al.*, 1987). Deux études portant sur les effets de la RC sur la santé et la longévité ont également été menées sur des primates non humains aux États-Unis. La première fut initiée en 1987 par l'Institut national du vieillissement (NIA) et la deuxième étude a débuté en 1989 à l'Université de Wisconsin-Madison (UW) (Mattison *et al.*, 2017; Mattison *et al.*, 2012). Bien que ces études aient rapporté des conclusions divergentes sur les effets de la RC sur la longévité, une étude récente ayant combiné l'ensemble des données obtenues par les deux études originales a démontré que la RC augmente significativement la longévité et améliore l'état de santé des singes. Cette étude suggère donc que les effets de la RC rapportés sur modèle animal puissent être transférables à l'Homme (Mattison *et al.*, 2017).

Bien que la RC soit difficile à mettre en œuvre dans les essais cliniques chez les humains, une étude épidémiologique récente a rapporté des données suggérant son effet bénéfique sur la longévité chez l'Homme. En effet, les habitants d'Okinawa (Japon), qui consomment respectivement 15 % et 40 % d'apports caloriques journaliers en moins comparativement au reste du Japon et aux États-Unis, est la ville ayant le plus grand nombre de centenaires au monde (50 centenaires pour 100,000 habitants). Il est également important de souligner que ces centenaires sont en excellente santé et présentent une prévalence de pathologies chroniques très faible pour cette population (*The Okinawa Centenarian Study* ; (Omodei & Fontana, 2011; Suzuki *et al.*, 2010).

À ce jour, la RC constitue une des stratégies interventionnelle non pharmacologique la plus efficace pour prévenir ou retarder les détériorations liées à l'âge. Comme nous le verrons par la suite en détails, la RC compte parmi les interventions non pharmacologiques les plus efficaces pour atténuer le développement de la sarcopénie (Fontana *et al.*, 2010; Mercken *et al.*, 2013).

1.4.2 La restriction calorique : effets anti-sarcopéniques

1.4.2.1 Restriction calorique, vieillissement et masse musculaire

Plusieurs études se sont intéressées aux effets de la RC sur la masse musculaire. Hepple *et al.*, ont rapporté que des rats âgés de 35 mois soumis à une RC présentaient une masse du muscle gastrocnémien supérieure à ceux des rats âgés de 35 mois nourris *ad libitum* (AL) (Hepple *et al.*, 2005). Cette différence de masse musculaire est d'autant plus impressionnante que chez des rats jeunes adultes RC (âgés 8 mois) présentent une masse du muscle gastrocnémien inférieure aux rats de même âge nourris *ad libitum*. En lien avec la préservation de la masse musculaire au cours du vieillissement par la RC, plusieurs études ont démontré que la RC atténue la réduction du nombre de fibres musculaires provoquée par le vieillissement (Dirks &

Leeuwenburgh, 2004; McKiernan *et al.*, 2004; Payne *et al.*, 2003; Phillips & Leeuwenburgh, 2005). McKiernan *et al.*, en étudiant les effets d'une RC de 40 % débutée à 4 mois chez le rat, ont rapporté que la RC permet de conserver significativement le nombre de fibres musculaires entre 21 et 36 mois au sein des muscles: soléaire, vaste externe et droit fémoral (McKiernan *et al.*, 2004). Phillips *et al.*, ont quant à eux rapporté que le nombre de fibres musculaires par mm² au sein du muscle vaste latéral superficiel de rats âgés (26 mois) est supérieur en RC (40 %) qu'en condition AL (Phillips & Leeuwenburgh, 2005). Ainsi, la RC permet d'atténuer les effets du vieillissement sur la masse musculaire.

1.4.2.2 Restriction calorique, vieillissement et force musculaire

Comme énoncé auparavant, la force spécifique musculaire diminue au cours du vieillissement. Cette observation est vérifiée aussi bien chez l'Homme (Bruce *et al.*, 1989) que chez les rongeurs (Aspnes *et al.*, 1997; Hepple *et al.*, 2005; Payne *et al.*, 2003). Bien que peu d'études se soient intéressées aux effets de la RC sur la force spécifique lors du vieillissement, l'étude menée par Hepple *et al.*, a rapporté des résultats particulièrement impressionnants. En effet, alors qu'ils ont constaté un déclin très sévère de la force spécifique chez les animaux en condition AL âgés de 35 mois en comparaison avec les rats jeunes adultes, aucune différence entre les rats RC âgés de 35 mois et les jeunes adultes n'a été observée (Hepple *et al.*, 2005). La RC de longue durée chez les rongeurs permet ainsi d'abolir le déclin de force spécifique lié à l'âge.

1.4.2.3 Restriction calorique, vieillissement et fonctions mitochondriales

Une altération de l'énergétique mitochondriale est souvent rapportée comme une caractéristique du vieillissement (Lin & Beal, 2006). Plusieurs études ont démontré des effets bénéfiques de la RC sur les fonctions mitochondriales, incluant notamment une diminution de la production de RLDO (Roth *et al.*, 2005; Sohal & Dubey, 1994), une diminution des dommages oxydatifs (Gredilla *et al.*, 2001; Lanza *et al.*, 2012), une amélioration de la composition en acides gras de la membrane plasmique (Zheng *et al.*, 2005), une réduction des fuites de protons (Cohen *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2008; Maalouf *et al.*, 2009) ainsi qu'une amélioration de l'efficacité mitochondriale (Desai *et al.*, 1996; Hepple *et al.*, 2005; Lanza *et al.*, 2012). (Desai *et al.*, 1996; Hepple *et al.*, 2005; Lanza *et al.*, 2012). Dans leur étude, Hepple *et al.*, ont rapporté une diminution chez le rat en condition AL de la consommation maximale d'oxygène musculaire de 46 % à l'âge de 35 mois par rapport à l'âge de 8 à 10 mois. En revanche, aucune différence de consommation maximale d'oxygène n'a été observée entre les rats jeunes adultes et les rats RC de 35 mois (Hepple *et al.*, 2005). La RC semble donc abolir les effets du vieillissement sur l'énergétique mitochondriale des cellules musculaires.

Il a également été rapporté que la RC augmente l'expression de PGC-1 α , co-activateur du récepteur activé par les proliférateurs de peroxysomes (PPAR) 1 alpha, un co-activateur de transcription jouant un rôle clé dans la régulation de la biogenèse mitochondriale (Austin & St-Pierre, 2012). Ranhotra *et al.*, ont constaté un niveau de PGC-1 α trois fois plus élevé chez les souris en condition de RC comparativement aux souris en condition AL (Ranhotra, 2010). Cette augmentation de l'expression de PGC-1 α régulerait positivement les gènes nécessitant une co-activation de PGC-1 α , favorisant ainsi une augmentation du métabolisme énergétique. Cependant, les effets de la RC sur l'expression de PGC-1 α sont controversés. En effet, Lanza *et al.*, ont récemment rapporté que la RC chronique n'avait aucun effet sur l'expression de PGC-1 α et sur le programme de biogenèse mitochondriale (Lanza *et al.*, 2012). Les

mécanismes par lesquels la RC exerce ses effets bénéfiques sur l'énergétique mitochondriale, notamment au cours du vieillissement, restent donc incertains.

1.4.2.4 Restriction calorique, vieillissement et apoptose

Comme nous l'avons vu précédemment l'apoptose est considérée comme un mécanisme jouant un rôle important dans le développement de la sarcopénie. Plusieurs études ont démontré que la RC atténue l'apoptose contrôlée par les mitochondries lors du vieillissement musculaire (Dirks & Leeuwenburgh, 2004; Leeuwenburgh *et al.*, 2005; Wohlgemuth *et al.*, 2010). À titre d'exemple, Dirks et Leeuwenburgh ont démontré que le contenu musculaire en caspase 3 clivée, un marqueur d'apoptose déclenché par les mitochondries était augmenté dans les muscles de rats âgés nourris AL, une augmentation abolie par la RC (Dirks & Leeuwenburgh, 2004).

De plus, Phillips et Leeuwenburgh ont également rapporté que l'activation des voies de signalisation inflammatoires et apoptotiques contrôlées par le TNF- α induite par le vieillissement musculaire chez les rats nourris AL était atténuée dans le muscle squelettique de rats âgés soumis à une RC (Phillips & Leeuwenburgh, 2005). En conclusion, la RC permet d'atténuer les effets du vieillissement sur la perte de masse musculaire, sur la force spécifique et protège également contre les dysfonctions mitochondriales induites par le vieillissement. Cependant, il est important de noter ici que les effets spécifiques de la RC sur la morphologie mitochondriale lors du vieillissement musculaire restent à ce jour inconnus.

1.5 Muscles glycolytiques et oxydatifs

1.5.1 Généralités

Un muscle est un assemblage de plusieurs types de fibres musculaires. En effet, les fibres sont distinguées selon leur vitesse maximale de raccourcissement (lente ou rapide) et leur principale voie de synthèse d'ATP (glycolytique ou oxydative) (Tortora *et al.*, 1994). Il existe quatre types de fibres : les fibres de type I, oxydatives et à contraction lente; les fibres de type IIa à métabolisme oxydatif développé et contraction rapide ; les fibres de type IIx, glycolytiques chez l'Homme à métabolisme oxydatif développé chez les rongeurs, contraction très rapide, et les fibres de type IIb, absentes chez l'Homme, glycolytiques et à contraction extrêmement rapide chez les rongeurs. Chaque type de fibre se retrouve dans des proportions différentes au sein de chaque muscle. Les fibres oxydatives lentes (I) possèdent beaucoup de mitochondries, de myoglobine, mais peu de glycogène. Ce type de fibre présente en conséquence une grande résistance à la fatigue et est particulièrement important pour les efforts de longue durée, car elles utilisent l'oxygène apporté par les multiples capillaires sanguins qui les entourent pour produire de l'énergie (ATP) (Tortora *et al.*, 1994). Les fibres glycolytiques rapides (IIb chez l'animal et IIx chez l'Homme) sont des fibres dites « blanches » qui sont peu résistantes à la fatigue, mais génèrent beaucoup de puissance. Ces fibres sont pauvres en myoglobines, en mitochondries et en capillaires sanguins, elles utilisent spécifiquement le glycogène comme substrat énergétique pour produire de l'ATP par le biais de la respiration cellulaire et la glycolyse anaérobie d'où l'appellation « fibres glycolytiques ». Les fibres intermédiaires, de type IIa chez l'Homme, et de types IIa et IIx chez les rongeurs, utilisent un double métabolisme, oxydatif et glycolytique, et elles sont bien plus résistantes que les fibres glycolytiques à la fatigue, mais ne développent pas autant de puissance (Shen *et al.*, 2016; Vigneron *et al.*, 1976).

Dans ces différents types de fibres, l'ATP est synthétisé de manière différente. Au sein des fibres oxydatives, l'ATP est majoritairement produite par le système aérobie.

Dans les fibres glycolytiques, l'ATP est majoritairement produite par le système anaérobie. Le processus aérobie produit de l'ATP en grande quantité via l'oxydation complète des glucides et des lipides (Tortora *et al.*, 1994). Le processus anaérobie repose quant à lui sur l'utilisation de la phosphocréatine (PCr) et de la glycolyse a produit terminal lactate. Ces voies métaboliques anaérobies permettent une vitesse de resynthèse de l'ATP extrêmement rapide. Cependant, leur utilisation à puissance maximale entraîne l'accumulation de métabolites associés à la fatigue musculaire (H^+ , Pi et ADP), expliquant de ce fait l'épuisement des fibres glycolytiques rapides. Le phénotype musculaire peut évoluer avec différentes pathologies ou selon le type d'activité physique pratiquée.

Le rôle du muscle squelettique ne se limite pas à la mobilité ou la posture, il joue également un rôle central dans le maintien de l'homéostasie métabolique de l'organisme. Outre la consommation d'énergie, le muscle squelettique stocke le glycogène et doit donc continuellement s'adapter à la demande énergétique induite par l'activité physique et aux différentes variations nutritionnelles.

1.5.2 Typologie et fonctions mitochondriales

Les muscles glycolytiques et oxydatifs ont des caractéristiques métaboliques différentes. Par exemple, il est reconnu que le contenu en mitochondries diffère grandement d'un type de fibre à un autre (Gouspillou *et al.*, 2014a). Cependant, ce n'est pas la seule caractéristique reliée aux mitochondries qui diffère d'un type de fibre à l'autre. En effet, plusieurs études ont rapporté des différences significatives entre les types de fibres concernant la production mitochondriale des RLDO (Anderson & Neufer, 2006; Picard *et al.*, 2008; Picard *et al.*, 2012). La libération d' H_2O_2 (un dérivé de l'anion super oxyde) par les mitochondries de fibres rapides est entre deux et trois fois supérieure à celle des mitochondries de fibres lentes (Picard *et al.*, 2008; Picard *et al.*, 2012). Des différences ont également été rapportées

concernant la régulation du PTPm par le Ca^{2+} . En effet, il a été rapporté que la capacité de rétention calcique des mitochondries contenues dans les fibres rapides est bien supérieure à celle des fibres lentes (Picard *et al.*, 2012). Pris dans leur ensemble, ces résultats indiquent qu'il existe une spécialisation mitochondriale en fonction du type de fibres (Picard *et al.*, 2012). Cette réalité, souvent ignorée dans la littérature, a pourtant des implications importantes. En effet, cette réalité impose d'étudier des fibres oxydatives et glycolytiques afin de parvenir à une vision globale plus juste afin de déterminer l'effet de la RC et du vieillissement sur les mitochondries musculaires.

1.6 Objectifs et hypothèses

1.6.1 Énoncé du problème

Comme nous l'avons vu au sein de cette introduction, de multiples données expérimentales indiquent que les mitochondries accumulent des dysfonctions au cours du vieillissement musculaire et jouent un rôle dans le développement de la sarcopénie.

La RC est une intervention non pharmacologique qui est connue pour ses bienfaits en matière de longévité et d'effet « anti-vieillesse » chez le rongeur (Weindruch & Walford, 1982). Au niveau musculaire, la RC atténue le développement de la sarcopénie. Cependant, les effets d'une RC sur la morphologie et les fonctions mitochondriales dans des muscles oxydatifs et glycoliques des rats âgés restent peu connus. Le maintien de la forme mitochondriale dépend d'un équilibre constant entre les événements de fusion et de fission, et l'interférence avec l'un ou l'autre de ces processus entraîne l'extension du réseau mitochondrial, ou sa fragmentation. Une étude de notre laboratoire a récemment mis en évidence que la complexité de la morphologie mitochondriale augmente au sein d'un muscle squelettique âgé (Leduc-Gaudet *et al.*, 2015). De plus, les résultats de cette étude soulignent que les souris

âgées ont un ratio de Mitofusine 2 (Mfn2) (fusion) et *Dynamin related protein 1* (Drp1) (fission) plus élevé que les souris jeunes, suggérant ainsi un changement de la balance fusion/fission en faveur de la fusion dans les muscles âgés (Leduc-Gaudet *et al.*, 2015). Il est maintenant nécessaire de définir si les effets protecteurs de la RC impliquent une atténuation des effets du vieillissement sur la morphologie et la dynamique des mitochondries.

1.6.2 Objectifs

L'objectif principal de cette étude est de déterminer si la RC permet d'atténuer les effets du vieillissement musculaire sur la morphologie et la dynamique des mitochondries. Les objectifs secondaires seront de déterminer les effets de la RC et du vieillissement sur la taille et la proportion des différents types de fibres musculaires, ainsi que sur le contenu en mitochondries au sein de deux types de muscles, glycolytique et oxydatif.

1.6.3 Hypothèses

L'hypothèse actuellement avancée pour expliquer les effets protecteurs et "anti-vieillessement" de la RC est que cette dernière améliore le fonctionnement des mitochondries (Weindruch & Walford, 1982). Sur la base de liens qui unis fonctions et morphologie des mitochondries (Picard *et al.*, 2011a), nous émettons les hypothèses suivantes :

- Dans le muscle gastrocnémien blanc, un muscle glycolytique, les effets du vieillissement musculaire chez le rat sur la morphologie et la dynamique mitochondriale seront similaires à ceux rapportés chez la souris (augmentation

de la complexité des mitochondries IMF et élargissement des mitochondries SS) (Leduc-Gaudet *et al.*, 2015).

- Dans le muscle soléaire (un muscle oxydatif), les effets du vieillissement musculaire sur la morphologie et la dynamique mitochondriale seront similaires à ceux observés dans le gastrocnémien blanc.
- La RC atténuera les effets du vieillissement sur la morphologie et la dynamique des mitochondries.
- La RC atténuera les effets du vieillissement sur la taille et la proportion des fibres musculaires.

CHAPITRE II

MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 Animaux et Tissus

Pour ce projet, des rats Sprague-Dawley jeunes adultes (9 mois) et âgés (21 mois) ont été utilisés. Ces rats ont été fournis par le Réseau Québécois de Recherche sur le Vieillessement (RQRV), un réseau qui offre à ses membres un accès à leurs colonies de rats nourris *ad-libitum* (AL) ou ayant subi une RC. Ces rats ont été utilisés avec l'approbation du Comité Institutionnel de Protection des Animaux (CIPA) de l'UQAM (protocole éthique CIPA875).

Trois groupes ont été ainsi étudiés : 1) Rats âgés nourris AL (O-AL, n=4), 2) Rats âgés soumis à une RC (O-CR, n=7), 3) Jeunes nourris AL (YA-AL, n=9). La RC pour les rats âgés a débuté à l'âge de 8 mois, et est passée progressivement de -20 % à -40 % d'apport calorique quotidien, pour que celle-ci n'affecte pas le développement normal des animaux. Les rats âgés ont été étudiés à 21 mois (13 mois de RC), alors que les rats jeunes adultes ont quant à eux été étudiés à 9 mois. Les muscles soléaires (oxydatifs) et gastrocnémiens blancs (glycolytiques) ont été étudiés. La RC utilisée a été coordonnée par le RQRV (responsables : Dre Guylaine Ferland et Pre Pierrette Gaudreau). Un total de 20 rats Sprague-Dawley fut disponible.



Figure 2.1 : Rats Sprague-Dawley

Légende : Photographie de rats spragues-dawley mâles âgés sous restriction calorique (à droite) et condition *ad libitum* (à gauche) *RQRV*

http://www.rqrv.com/fr/infra_colonie.php

2.2 Composition de la diète : Restriction Calorique

Les rats Sprague Dawley âgés de deux mois (provenance Charles Rivers Canada, St-Constant, QC) ont été logés individuellement dans des cages avec une humidité de 65 %, et une température de 22 °C, suivant un cycle jour/nuit de 12 heures. Les animaux âgés ont été nourris par la diète (Harland, Teklad, Madison, WI) utilisée par le RQRV (composition: Protéines 19%, Glucides 64%, Lipides 17%, avec un supplément en vitamines et minéraux AIN-93G). À 8 mois, un des groupes de rats fut soumis à une RC de 20 % pendant deux semaines et à 40 % par la suite (par rapport à la nourriture consommée par les rats O-AL) (Figure 2.2). Les rats jeunes adultes eux ont été soumis à un régime alimentaire contrôle comparable (Charles River Rodent Diet # 5075, St-Constant, QC, Canada; composition : Protéines 21%, Glucides 66%, Lipides 13%).

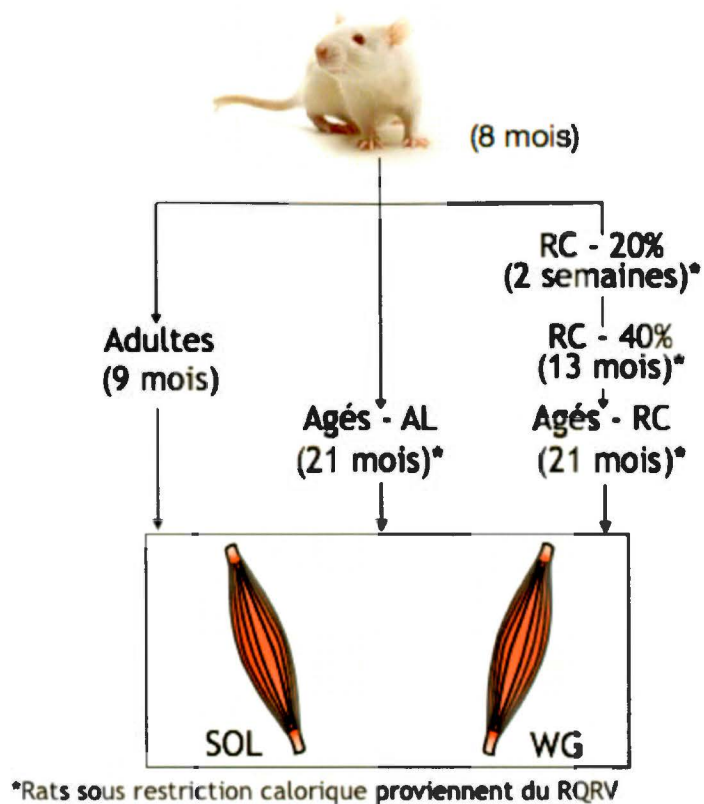


Figure 2.2 : Design expérimental

Légende : Schéma du design expérimental des trois groupes de rats utilisés.

2.3 Protocole et sacrifice des animaux

Le sacrifice des animaux a été effectué par décapitation pour les besoins d'un autre projet de recherche dirigé par la Dre Ferland. Les muscles soléaires et gastrocnémiens blancs ont été prélevés tout de suite après la décapitation.

2.4 Préparation des muscles

Les muscles récoltés ont été sous-divisés pour les expériences souhaitées (microscopie électronique, histologie et immunobuvardage). Pour chaque muscle, la partie destinée aux analyses histologiques fut insérée dans de la gomme tragacanth disposée sur une lamelle de liège. Une fois cet échantillon musculaire positionné, il fut congelé dans de l'isopentane préalablement refroidi dans de l'azote liquide. Ces échantillons ont été stockés à -80 °C jusqu'à leurs utilisations.

Concernant la préparation des muscles pour la microscopie électronique, les muscles récoltés ont été coupés en petits morceaux pour une meilleure fixation et disposés dans des tubes eppendorfs contenant la solution de fixation (2 % glutéraldéhyde dans 0,1 M de cacodylate, pH 7,4). Les morceaux de muscles ont été laissés à température ambiante pendant 1 heure, puis stockés à 4 °C jusqu'à leurs utilisations. Les tissus musculaires restants ont été congelés dans de l'azote liquide puis conservés à -80 °C. Ces tissus ont permis la quantification de diverses protéines d'intérêts par immunobuvardage.

2.5 Histologie

2.5.1 Préparation de coupes musculaires pour analyses histologiques

À partir des échantillons musculaires préparés pour l'histologie, des coupes de 8 µm d'épaisseur en orientation transversale ont été réalisées à l'aide d'un cryostat à une température de -18 °C (Superfrost). Ces coupes ont été utilisées pour déterminer la taille des fibres musculaires, la proportion des différents types de fibres et l'activité de l'enzyme Succinate DésHydrogénase (SDH).

2.5.2 Immunomarquage : Étude du phénotype musculaire (taille et proportions des différents types de fibres)

Afin d'étudier le phénotype musculaire, les chaînes lourdes de myosines (CMH) I, IIa et IIb furent immunomarquées en utilisant une méthode décrite précédemment (Leduc-Gaudet *et al.*, 2015). Les coupes ont dans un premier temps été réhydratées avec du tampon phosphate salin (PBS, pH 7,2), ensuite bloquées dans du sérum de chèvre (10 % sérum de chèvre (1 ml) dans PBS (9 ml)) et incubées pendant une heure à température ambiante avec la solution d'anticorps primaire (*Developmental Studies Hybridoma Bank*, DSHB, Université de l'Iowa, Iowa City IA, USA) composée d'anticorps de souris IgG2b : monoclonal anti-MHC de type I (BA-F8, 1:25), IgG1 de souris : monoclonal anti-CMH de type IIa (SC-71, 1:200), monoclonal IgM anti-CMH de souris IIb (BF-F3, 1:200) et un anticorps de lapin IgG : anti-laminine polyclonale (Sigma L9393, 1:750). Après aspiration, les coupes ont été lavées trois fois 5 minutes dans du PBS, suivi d'une incubation de 1 heure à température ambiante avec la solution d'anticorps secondaire contenant : Alexa Fluor 350 IgG2b (y2b) anticorps de chèvre anti-souris (A-21140, 1:500; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), Alexa Fluor 594 IgG1 (y1) 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). Ensuite, les coupes ont été lavées une nouvelle fois, trois fois 5 minutes dans du PBS puis montées en lamelles avec du *Prolong Gold* (Invitrogen, P36930). À partir de ces coupes musculaires, des images ont été acquises à l'aide d'un microscope à fluorescence *Zeiss Axio Imager 2* en désignant des régions d'intérêts pour l'analyse de la taille et des différents types de fibres musculaire. Les analyses de ces images ont été réalisées à l'aide logiciel *ImageJ* (NIH).

2.5.3 Détermination *in situ* de l'activité de la succinate déshydrogénase (SDH)

Afin de déterminer l'activité de la SDH *in situ*, des coupes de muscle de 8 µm ont été utilisées. 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 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 10 minutes. Après l'incubation, les coupes ont été lavées trois fois 5 minutes dans de l'eau distillée. Enfin ces coupes ont été montées sous lamelles avec un milieu de montage aqueux Prolong Gold (Invitrogen, P36930). Afin d'assurer les mêmes conditions pour chaque coupes, celles ci ont été incubées dans le même milieu et pendant un temps égal. Les images de ces coupes ont ensuite été prises à l'aide d'un microscope (Zeiss Axio Imager 2) et analysées à l'aide du logiciel *ImageJ* (NIH).

2.5.4 Détermination de l'expression de protéines impliquées dans la dynamique mitochondriale par Western Blot

Entre 30 et 60mg de muscle ont été homogénéisés dans un tampon d'extraction RIPA (*Radio-Immuno-Precipitation Assay*), contenant 50 mM de Tris base, 150 mM de chlorure de sodium (NaCl), 1 % de Triton X-100, du sodium deoxycolate à 0,5 %, 0,1 % de SDS et 10 µl/ml d'un cocktail d'inhibiteurs de protéases (P8340; Sigma, St. Louis, MO, USA). Les muscles ont été homogénéisés par des billes métalliques à l'aide d'un robot d'homogénéisation à 4 °C. La teneur en protéines des surnageants a été déterminée par la méthode de Bradford (Bradford, 1976) en utilisant une solution titrée d'albumine sérique de bovin comme standard (Gouspillou *et al.*, 2014). Afin d'obtenir une concentration de 1,5 mg/ml, les surnageants ont été aliquotés, mélangés avec un tampon de Laemmli 4X puis enfin chauffés à 95 °C pendant 5 min.

Une fois les échantillons ainsi préparés, 25 µg de protéines ont été par la suite placés dans les puits de gels SDS-PAGE 8 ou 12% d'acrylamide. Les protéines ont été séparées selon leurs poids moléculaires par électrophorèse, transférées sur une membrane de fluorure de polyvinylidène (PVDF) (Gouspillou *et al.*, 2014b). Les membranes ont été bloquées pendant 1 heure à température ambiante dans un tampon de blocage (Lait 5 % dans du TBS-T (*Tris-Buffered Saline*, 0,1 % Tween 20)), puis incubées avec les anticorps primaires suivants dilués dans le tampon de blocage : anticorps monoclonal anti-DRP1 de souris (ab56788; 1 :1000; Abcam), anticorps monoclonal anti-FIS1 (Life science, ALX210, 1:1000), anticorps polyclonal anti-MFN2 de lapin (ab50843; 1 :1000; Abcam). Les membranes ont été lavées six fois durant 5 minutes dans du TBS-T et ont été ensuite incubées une nouvelle fois 1 heure avec les anticorps secondaires conjugués à la HRP (anti-lapin Ab6721, 1:5000; anti-souris Ab6728, 1:5000; Abcam) (Gouspillou, *et al.*, 2014) dilués dans du tampon de blocage à température ambiante. Les membranes ont été ensuite révélées à l'aide d'un substrat de chimioluminescence (Biorad, *clarity western ECL substrat*, 170-5060). Les images ont été collectées à l'aide du système d'imagerie *ChemiDocTM Touch Imaging System* (Biorad). Les résultats obtenus ont été normalisés par rapport aux protéines totales des membranes, grâce à la technologie *Stain Free* de Biorad (Mini PROTEAN® TGX Stain Free TM Gels). Les analyses de ces westerns blots ont été réalisées à l'aide du logiciel *ImageJ* (NIH).

2.5.5 Détermination de la densité et de la morphologie des mitochondries en Microscopie Electronique par Transmission (MET)

La Microscopie Electronique par Transmission (MET) a été utilisée pour quantifier les effets de la restriction calorique sur la densité mitochondriale et la morphologie de deux types de mitochondries musculaires (SS et IMF). La technique de préparation des fragments de tissus pour l'observation au microscope électronique comporte quatre étapes : la fixation, la déshydratation, l'imprégnation et enfin la

polymérisation. La méthode est détaillée au sein de Picard *et al.*, 2013. Les échantillons du soléaire et du gastrocnémien blanc, après avoir été récoltés, ont été placés en suspension au sein d'une solution de fixation de glutaraldéhyde à 2 % dans du tampon de cacodylate 0,1 M (pH 7,4) (Picard *et al.*, 2013b). C'est par Mme Diane Gingras, Université De Montréal (UDEM), que ces échantillons ont été traités sous MET. Les échantillons ont donc été fixés pendant 1 heure dans du tétroxyde d'osmium à 1 %, déshydratés au sein d'une concentration croissante d'acétone. Pour pouvoir vérifier l'orientation du tissu musculaire avant la coupe finale (ultra-fine), des coupes de 1 μm d'épaisseur ont été colorées avec 1 % de bleu de toluidine. Enfin des coupes ultra-fines (70 nm) ont été effectuées selon une orientation longitudinale et transversale sur un ultramicrotome *UltracutS* (Leica).

Ces coupes ont ensuite été étirées de façon à éliminer les compressions et montées sur des grilles de cuivre, avant d'être colorées avec de l'acétate d'uranyle aqueux à 2 % et du citrate de plomb (Leica). Ces coupes ont été photographiées à l'aide d'un microscope électronique Philips CM 100 (FEI) et les micrographies ont été capturées par une camera numérique AMR XR80 CCD à une magnification de x 7900.

Sur les micrographies ainsi obtenues, les mitochondries ont été tracées manuellement à l'aide du logiciel *ImageJ* afin de quantifier les paramètres morphologiques suivants : l'aire (μm^2), périmètre (μm), circularité $4\pi \cdot (\text{aire}/\text{périmètre}^2)$, le rapport d'aspect étant une mesure du rapport longueur sur la largeur ((axe majeur)/(axe mineur)), la rondeur $4 \cdot (\text{aire}/(\pi \cdot (\text{l'axe majeur})^2))$, le diamètre de Feret (distance la plus longue (μm) entre deux points de la mitochondrie étudiée), le minimum de feret qui correspond au diamètre le plus petit de la mitochondrie et le facteur de forme $((\text{périmètre})/(4\pi \cdot \text{surface}))$, une mesure sensible à la complexité et à l'aspect ramifié des mitochondries.

2.6 Quantification et analyses statistiques

Les différences de poids corporel, de taille moyenne des fibres et de valeurs moyennes des descriptions de formes utilisées pour évaluer la morphologie mitochondriale ont été testées à l'aide d'une ANOVA ordinaire à un facteur suivie d'analyses post hoc en utilisant la méthode de graduation en deux étapes de Benjamini, Krieger et Yekutieli pour corriger les comparaisons multiples (avec $p < 0,05$ et $q < 0,1$). Les différences de poids musculaire, de proportion de type de fibre, de distribution de taille de fibre, de taille de fibre par type ont été testées en utilisant une ANOVA bidirectionnelle ordinaire suivie d'analyses post-hoc en utilisant la méthode de graduation en deux étapes de Benjamini, Krieger et Yekutieli pour corriger les comparaisons multiples (avec $p < 0,05$ et $q < 0,1$). Les différences dans la distribution des valeurs des descripteurs de forme utilisés pour évaluer la morphologie mitochondriale ont été testées en utilisant un test de Kolmogorov-Smirnov comparant les distributions cumulatives. Toutes les analyses statistiques ont été effectuées en utilisant *GraphPad Prism* (GraphPad Software 7, San Diego, CA, USA).

CHAPITRE III

EFFECTS OF AGING AND CALORIC RESTRICTION ON MITOCHONDRIAL MORPHOLOGY AND DYNAMICS IN RAT OXIDATIVE AND GLYCOLYTIC MUSCLES

Julie Faitg^{1,2}, Jean Philippe Leduc-Gaudet^{2,3,4}, Olivier Reynaud^{2,4}, Guylaine Ferland^{5,6}, Pierrette Gaudreau^{7,8} and Gilles Gouspillou^{2,9}

(Article prêt à être soumis)

Contributions des co-auteurs : GG à conçu le projet et conçu les expériences. GG, JF, JPLG, OR ont effectué les expériences. JF, JPLG, GG, GF, PG ont contribué à l'analyse et à l'interprétation des données. JF, GG, GF et PG ont écrit la première ébauche du manuscrit. Tous les auteurs ont révisé le manuscrit et approuvé sa version finale. Tous les auteurs acceptent d'être responsables de tous les aspects du travail en s'assurant que les questions liées à l'exactitude ou à l'intégrité de toute partie sont étudiées et résolues de façon appropriée. Toutes les personnes désignées comme auteurs sont éligibles et tous ceux qui remplissent les conditions d'auteur sont répertoriés.

Effects of aging and caloric restriction on mitochondrial morphology and dynamics in rat oxidative and glycolytic muscles

Julie Faitg^{1,2}, Jean Philippe Leduc-Gaudet^{2,3,4}, Olivier Reynaud^{2,4}, Guylaine Ferland^{5,6}, Pierrette Gaudreau^{7,8} and Gilles Gouspillou^{2,9}

Affiliations: ¹Département de Biologie, Faculté des Sciences, UQAM, Montréal, Canada; ²Groupe de recherche en Activité Physique Adaptée, Montréal, Canada; ³Meakins-Christie Laboratories, Department of Medicine and Division of Experimental Medicine, McGill University, Québec; ⁴Département des sciences de l'activité physique, Faculté des Sciences, UQAM, Montréal, Canada; ⁵Institut de cardiologie de Montréal Research Center, Montreal, QC, Canada H4J 1C5; ⁶Department of Nutrition, University of Montreal, Montreal, QC, Canada H1T 1C8; ⁷Laboratory of Neuroendocrinology of Aging, *Centre Hospitalier de l'Université de Montréal* Research Center (CRCHUM), 900 St-Denis street, R Pavillon, Rm R05.436B-02, Montreal, QC, H2X0A9, Canada; ⁸Department of Medicine, University of Montreal, Montreal, QC, Canada H3C 3J7; ⁹Centre de Recherche de l'Institut Universitaire de Gériatrie de Montréal, Montréal, Canada.

Corresponding author: **Gilles Gouspillou**

Département des Sciences de l'activité physique

Faculté des sciences, UQAM, Pavillon SB, SB-4640

141, Avenue du Président Kennedy, Montréal, Qc, Canada, H2X 1Y4

Email: gouspillou.gilles@uqam.ca

Keywords: Aging, nutrition, sarcopenia, atrophy, skeletal muscle, electron microscopy

Running title: Impact of aging and caloric restriction on skeletal muscle mitochondrial morphology

3.1 Abstract

Skeletal muscle aging is associated with a progressive decline in muscle mass and strength, a biological process known as sarcopenia. A growing body of evidence indicates that mitochondrial dysfunction is causally involved in the development of sarcopenia and suggests that alterations in mitophagy and mitochondrial dynamics/morphology may represent mechanisms underlying the accumulation of dysfunctional mitochondria in aging muscles. Long-term caloric restriction (CR) is amongst the most efficient non-pharmacological intervention to attenuate sarcopenia in rodents and it is postulated that CR exerts its effects on mitochondria. However, many of these specific effects, especially in old skeletal muscles remain to be understood. Of particular interest, are the effects of aging and CR on skeletal muscle mitochondrial morphology and dynamics, both known to impact mitochondrial function. To address this issue, mitochondrial morphology in skeletal muscle was first investigated, in adult (9 months) *ad libitum*-fed (AL) (A-AL), old (22 months) AL-fed (O-AL) and old CR (22 months) (40% CR for 13 months; O-CR) rats, using quantitative 2-dimensional transmission electron microscopy (TEM). Here we show that CR attenuates the impact of aging on the muscle mass to body weight ratio, a sarcopenic index. CR also prevented the effects of aging on muscle fiber type composition in both the oxidative soleus (SOL) and glycolytic gastrocnemius muscles (GAS). In addition, the SOL of O-AL rats displayed fragmented sub-sarcolemmal (SS) and intermyofibrillar (IMF) mitochondria vs A-AL rats and CR attenuated this aging-related fragmentation of SS and IMF mitochondria in the SOL. The highly glycolytic white gastrocnemius (WG) of O-AL rats displayed enlarged SS mitochondria and more complex and branched IMF mitochondria than in A-AL rats. CR had only a marginal anti-aging effect on mitochondrial morphology. In the SOL of O-AL and O-CR, the content of the pro-fission protein Drp1 was higher than in A-AL. Moreover, O-CR rats displayed a higher content of the pro-fusion protein Mfn2 vs A-AL. In the WG, the content of Drp1, Fis1 (pro-fission), and Mfn2 were higher in O-AL vs A-AL. No difference was observed in the content of Drp1 in O-AL vs O-CR, but O-CR displayed significantly lower Mfn2 and Fis1 contents vs O-AL. Taken altogether, our results reveal for the first time that the effects of aging and CR on mitochondrial morphology and dynamics are complex and muscle-specific.

3.2 Résumé

Le vieillissement des muscles squelettiques est associé à une diminution progressive de la masse et de la force musculaire, un processus biologique connu sous le nom de sarcopénie. Un nombre croissant de preuves indique que le dysfonctionnement mitochondrial est impliqué dans le développement de la sarcopénie et suggère également que des altérations de la mitochondrie et de la dynamique / morphologie mitochondriale pourraient représenter des mécanismes sous-jacents à cette accumulation de dysfonctions mitochondriales dans les muscles âgés. La restriction calorique (RC) est parmi les interventions non pharmacologiques les plus efficaces pour atténuer la sarcopénie chez les rongeurs et on pense que la RC intervient dans ses effets sur les mitochondries. Cependant, de nombreux effets spécifiques de la RC sur la biologie mitochondriale, en particulier dans le muscle squelettique âgé, restent inconnus. En particulier, les effets du vieillissement et de la RC sur la morphologie mitochondriale des muscles squelettiques, dont on sait qu'ils affectent la fonction mitochondriale, restent largement sous étudié. Pour aborder ce problème, la morphologie mitochondriale dans le muscle squelettique a été étudiée pour la première fois chez des rats jeunes adultes (9mois) nourris ad-libitum (AL) (A-AL), âgés (21mois) nourris AL (O-AL) et âgés (21mois) en restriction calorique (RC, 40% de restriction calorique pendant 13 mois, O-RC) en utilisant une approche de microscopie électronique à transmission bidimensionnelle quantitative. Nous montrons que la RC a atténué l'impact du vieillissement sur la masse musculaire au rapport du poids corporel, un indice sarcopénique. La RC a également aboli les effets du vieillissement sur la composition des types de fibres musculaires à la fois dans le muscle soléaire oxydatif (SOL) et les muscles gastrocnémiens glycolytiques (Gas). Le SOL des O-AL ont présenté des mitochondries SS et IMF fragmentées vs A-AL. La RC a atténué cette fragmentation liée au vieillissement des mitochondries SS et IMF dans le SOL. Les gastrocnémiens blancs hautement glycolytiques (WG) des rats O-AL présentaient des mitochondries SS agrandies et des mitochondries IMF plus complexes et ramifiées par rapport à leurs homologues plus jeunes. Dans le Gas, la RC n'a eu qu'un effet mineur à aucun effet anti-vieillessement sur la morphologie mitochondriale. La teneur en protéine de fission Drp1 était plus élevée dans le SOL des groupes O-AL et O-CR par rapport au groupe YA-AL. Cependant, seuls les rats O-CR présentaient une teneur plus élevée en protéine de fusion Mfn2 vs YA-AL. Le contenu de Drp1, Fis1 (protéine de fission) et Mfn2 était plus élevé dans le SOL de O-AL vs YA-AL alors qu'aucune différence dans le contenu des protéines régulant la dynamique mitochondriale n'a été observée entre O-CR et YA-AL dans le Gas. Pris ensemble, nos résultats révèlent pour la première fois que les effets du vieillissement et de la restriction calorique sur la morphologie et la dynamique des mitochondries sont complexes et spécifiques aux muscles.

Keywords: Vieillissement, Nutrition, Sarcopénie, Atrophie, Muscle squelettique, Microscopie électronique

3.3 Introduction

Skeletal muscle aging is associated with a progressive decline in muscle mass and function, a biological process known as sarcopenia [1]. Although sarcopenia focuses intensive research, the underlying mechanisms remain partly understood. Several lines of evidence indicate that the accumulation of mitochondrial dysfunction, appearing with aging in rodents and humans, contributes to the progressive decline of muscle mass and function [2-8]. More specifically, aged skeletal muscles display impaired mitochondrial bioenergetics [3-5] and an increase in mitochondrial-mediated apoptosis [6-8], which undoubtedly contribute to the aging-related decline in muscle mass and function. The implication of mitochondrial dysfunction in the sarcopenic process is further supported by the fact that overexpression of the mitochondrial-targeted catalase (an antioxidant enzyme) attenuates the loss of muscle mass occurring with aging [9].

Long-term caloric restriction (CR) is amongst the most efficient interventions to attenuate sarcopenia in rodents and is thought to exert most of its effects through an impact on mitochondria (see [10] for review). Indeed, CR has been shown to decrease mitochondrial reactive oxygen species (ROS) production [11, 12], increase mitochondrial coupling efficiency [12] and increase mitochondrial respiration per unit of mitochondria in aged muscles [13, 14]. CR has also shown to reduce markers of apoptosis in aged rat skeletal muscle [15]. However, many of the specific effects of CR on mitochondrial biology, especially in aging muscles, remain to be studied. For example, the impact of CR on mitochondrial dynamics and morphology has never been investigated in adult and old muscles. This is of particular importance since it is now established that mitochondrial morphology and function are interrelated, with changes in mitochondrial morphology affecting mitochondrial function [16-20] and *vice versa* [21].

In most cell types, and particularly in skeletal muscle [22], mitochondria display a complex and dynamic architecture. Indeed, mitochondria form a dynamic network able to undergo fusion and fission events, processes collectively known as mitochondrial dynamics [23] and regulated by fusion (Mitofusin 1 & 2 (Mfn 1 & 2) and Optic Atrophy 1 (OPA-1)), and fission (Dynamin-Related Protein 1 (DRP1) and mitochondrial-Fission 1 protein (FIS1) [23]) proteins. It was for instance shown in skeletal muscle of young animals that Mfn-1 and -2 deletion leads to abnormal mitochondrial morphology, severe mitochondrial dysfunction and a severe deficit in muscle growth [24]. Mitochondrial morphology and dynamic therefore play important roles in mitochondrial and skeletal muscle physiology. However, to date, the effects of aging on mitochondrial morphology and dynamics in skeletal muscle remain unclear and those of CR are currently unknown.

With aim of getting a better understanding of the impact of aging and caloric restriction on mitochondrial morphology in skeletal muscles, we investigated the morphology of sub-sarcolemmal (SS) and Intermyo-fibrillar (IMF) mitochondria in the glycolytic white gastrocnemius and the oxidative soleus muscles of adult and old rats using a 2-dimensional transmission electron microscopy approach [25, 26]..

3.4 Materials and methods

Animals and tissue collection

All animal procedures were approved by the *Comité Institutionnel de Protection des Animaux de l'UQAM* (#CIPA875) and the *Centre de recherche de l'hôpital du Sacré-Coeur de Montréal* #FRSQ.01 in compliance with guidelines of the Canadian Council on Animal Care. All experiments were performed on male Sprague-Dawley rats obtained either through Charles River (St-Constant, Québec, Canada) or the Quebec Network for Research on Aging (QNRA). Nine-month-old adults *ad libitum*-fed (A-AL, n = 9; Charles River Canada, St-Constant, QC), 22-month-old *ad libitum*-fed (O-AL, n = 4; QNRA) and 22-month-old rats submitted to CR for 13 months (O-CR, n = 11; QNRA) were studied. CR was initiated at 8 months of age, starting with a 20% restriction for two weeks, followed by a 40% CR for 13 months. Rats from both O-AL and O-CR groups were fed an AIN-93 based diet (Prot 22%, Carb 63%, Fat 15%; Harland, Teklad, Madison, WI). Animals from the O-AL group received the standard diet (TD.130770) throughout their lives, whereas rats from the O-CR group were administered this diet until the age of 8 months. At that stage, which corresponds to the start of the CR regimen, O-CR animals received a diet enriched in vitamins and minerals (TD.130771) to ensure both groups received comparable amounts of micronutrients. A-AL rats were fed with a comparable control diet (Charles River Rodent Diet # 5075, St-Constant, QC, Canada; composition: Prot 21%, Carb 66%, Fat 13%).

The animals were euthanized by rapid decapitation. The soleus (SOL) and gastrocnemius (GAS) muscles from left hind paws were collected. Both muscles were cut in half. A piece of the white portion of the GAS (WG) was isolated from the rest of the first half of the GAS. This portion of the WG and the first half of the SOL were sliced into small pieces (>1mm in thickness) and prepared for TEM analysis. The rest

of the SOL and the second half of the GAS were snap frozen in liquid nitrogen for Western blotting and stored at -80°C until use. The GAS and SOL from the right leg were removed. For each of these muscles, a slice of the entire midbelly was mounted on a cork in optimal cutting temperature compound and frozen in liquid isopentane cooled in liquid nitrogen. Histology samples were stored at -80°C until use. The tibialis anterior (TA), extensor digitorum longus (EDL) and plantaris (OL) muscles from both legs were finally isolated and weighted.

Transmission electron microscopy (TEM)

Muscle samples were fixed in 2% glutaraldehyde solution 0.1 M cacodylate buffer (pH 7.4). These samples were later post-fixed in 1% osmium tetroxide during 1h, dehydrated within an increasing concentration of acetone. To verify the orientation of the muscle tissue, 1µm thick sections were stained with toluidine blue prior to ultrathin sectioning. Ultrathin sections were cut in a longitudinal or transverse orientation on an UltracutS ultramicrotome (Leica). These sections were then stretched to remove compressions and mounted on copper grids before being stained with 2% aqueous uranyl acetate and lead citrate (Leica). Sections were then imaged using a Philips CM 100 electron microscope. Digital micrographs were captured using an AMT XR80 CCD digital camera at x7900 magnification.

Individual SS and IMF mitochondria from 4 A-AL, 4 O-AL and 4 O-CR rats were manually traced in longitudinal and transverse orientations using ImageJ software (NIH) (<https://imagej.nih.gov/ij/>) and to quantify the following morphological and shape descriptors: area (µm²), perimeter (µm), circularity $4\pi \cdot (\text{area} / \text{perimeter}^2)$, aspect ratio ((major axis)/(minor axis)): the aspect ratio being a measure of the length to width ratio, form factor ((perimeter) / (4π · surface)): a measure sensitive to the complexity and the branched appearance of the mitochondria, Feret's diameter (the longest distance (µm) between two points of the mitochondria studied) and minimum Feret diameter (corresponds to the smallest

diameter of the mitochondria) (Picard et al., 2012). Details on the number of SS and IMF mitochondria that were traced in both orientations in soleus and white gastrocnemius are available in Table 1.

Muscle sections for histology analysis

Eight-micron thick serial cross-sections were cut in a cryostat at -18°C and mounted on lysine coated slides (Superforst) to determine fiber type and mitochondrial content as previously described (Gouspillou et al., 2014).

Fiber typing in muscle sections

Muscle cross-sections were immunolabeled at the same time for the different myosin heavy chains (MHC) as previously described (Leduc Gaudet et al., 2015). Briefly, sections were rehydrated with PBS (pH 7.2), blocked using goat serum (10% PBS) and incubated for 1 h at room temperature with the following primary antibody cocktail: a mouse IgG2b monoclonal anti-MHC type I (BA-F8, 1:25), mouse IgG1 monoclonal anti-MHC type IIa (SC-71, 1:200), mouse IgM monoclonal anti-MHC type IIb (BF-F3, 1:200) and a rabbit IgG polyclonal anti-laminin (Sigma L9393, 1:750). Muscle cross sections were then washed 3 times in PBS before being incubated for 1 h with the following secondary antibody cocktail: Alexa Fluor 350 IgG2b (y2b), goat anti-mouse antibody (Invitrogen, A-21140, 1:500), Alexa Fluor 594 IgG1 (y1) goat anti-mouse (Invitrogen, A-21125, 1:100), Alexa Fluor 488 IgM goat anti-mouse (Invitrogen, A-21042, 1:500) and Alexa Fluor 488 IgG goat anti-rabbit (A-11008, 1:500). These sections were then washed three times in PBS and cover slipped using Prolong Gold (P36930; Invitrogen) as mounting medium. All primary antibodies targeting MHCs were purchased from the Developmental Studies Hybridoma Bank (DSHB, University of Iowa, IA).

Slides were imaged at 10X objective with Zeiss Axioplan2 fluorescence microscope (Zeiss, Oberkochen, Germany). Frames for analysis were randomly sampled across

each muscle section.

***In situ* determination of the succinate dehydrogenase activity**

Sections were stained for succinate dehydrogenase (SDH, complex II of the respiratory chain) activity. Muscle cross-sections were first allowed to reach room temperature. Sections were then incubated in a solution containing nitroblue tetrazolium (1.5mM), Sodium succinate (130mM), Phenazine methosulphate (0.2mM), and sodium azide (0.1mM) for 10 min at room temperature. Cross sections were then washed 3 times (3x5min) in distilled water, and cover-slipped using an aqueous mounting medium (Vector Labs, VectaMount AQ Medium, H-5501). All samples for each species were processed at the same time and using the same incubation solution, ensuring that all samples underwent the exact same experimental conditions.

Immunoblotting

The protein content of Mfn2, Drp1 and Fis1 were determined in muscle homogenates prepared from SOL and GAS muscles. Approximately 10 mg of each muscle were homogenized in 10 volumes of an extraction buffer composed of Tris base 50mM, NaCl 150mM, Triton X-100 1%, Sodium deoxycolate 0.5%, SDS 0.1% and 10µl/ml of a protease inhibitor cocktail (Sigma P8340). The homogenate was centrifuged at 15,000g for 15min at 4°C. Protein content in the supernatant was determined using the Bradford method.

Aliquots of supernatant were mixed with Laemli buffer and subsequently boiled at 95°C for 5 min. Approx. 30µg of proteins were loaded onto gradient (4-15%) and stain-free gels (Mini PROTEAN® TGX Stain-Free™ Gels, Biorad), electrophoresed by SDS-PAGE and then transferred to polyvinylidene fluoride membranes (PVDF, Biorad). A stain-free blot image was taken using the ChemiDoc™ Touch Imaging System for total protein measurement in each sample

lane. Membranes were blocked in 5% non-fat milk in Tris-Buffered Saline containing 0.1% Tween 20 (TBS-T) for 1h at room temperature and then probed for 1h using the following antibodies: anti-Mfn2 (Abcam, ab50843, 1:1000), anti-DRP1 (Abcam, ab56788, 1:1000), and anti-Fis1 (Life science, ALX210-907, 1:1000). All antibodies were diluted in blocking buffer. Membranes were then washed 6 times for 5 min each in TBS-T and subsequently incubated with HRP-conjugated secondary antibodies (Abcam Ab6728 or Ab6721, 1:5000) diluted in blocking buffer 1h at room temperature. Signals were detected using enhanced chemiluminescence substrate (Biorad, Clarity ECL substrate, 170-5060) using the ChemiDoc™ Touch Imaging System. All images were analyzed using the ImageLab software (Biorad). For each sample, the ECL signal for the protein of interest was normalized to the intensity of the stain-free blot image of the corresponding sample (i.e. the intensity of the stain-free blot image was used as loading control) [27].

Statistical analyses

Differences in animal body weight, mitochondrial density by TEM, average fiber size and average values of shape descriptions used to assess mitochondrial morphology were analyzed using an Ordinary one-way ANOVA followed by post-hoc tests using the two-stage step up method of Benjamini, Krieger and Yekutieli to correct for multiple comparisons ($p < 0.05$, $q < 0.1$). Differences in muscles weight, fiber type proportion, fiber size distribution, fiber size per type and contents of proteins regulating mitochondrial dynamics were analyzed using an Ordinary two-way ANOVA followed by post-hoc tests as described above. Differences in the distribution of shape descriptor values used to assess mitochondrial morphology were tested using a Kolmogorov-Smirnov test comparing cumulative distributions. All statistical analyses were performed using the Prism 7 software (GraphPad, San Diego, CA).

3.5 Results

Effects of aging and caloric restriction on body and muscles weights.

O-AL male rats displayed a significantly higher body weight vs A-AL rats. As expected, O-CR rats displayed the lowest body weight of our three groups (Fig. 1A). No difference in the wet weight of the SOL and EDL was observed among the groups (Fig. 1B). The GAS, PL and TA wet weights were significantly higher than in A-AL than in O-CR and O-AL rats (Fig. 1B). No difference was observed in muscles weights between O-AL and O-CR in the present study (Fig. 1B). When muscles weights were normalized to body weight, an index of sarcopenia, O-AL rats displayed a significantly lower TA, PL and GAS normalized weights compared to their younger counterparts (Fig. 1C). Importantly, O-CR animals displayed significantly higher TA, GAS and PL normalized weights than O-AL rats. No difference in muscle to body weight ratios were observed between O-CR and A-AL rats in the present study (Fig. 1C), suggesting that CR prevented the aging-related loss of relative muscle mass.

Effect of aging and caloric restriction on skeletal muscle phenotype

We first investigated the effects of aging and CR on skeletal muscle fiber sizes. To this end, muscles cross sections were immunolabeled for type I, IIa and IIb MHCs (Fig. 2A). In both SOL and GAS muscles, O-AL and O-CR displayed significantly lower overall fiber size vs A-AL (Fig. 2B). A shift to the left of the fiber size distribution in the SOL (Fig. 2C) and GAS (Fig. 2D) of the O-AL and O-CR rats was observed vs A-AL indicating an increase in the proportion of small fibers. In the SOL, O-AL and O-CR displayed significantly smaller type I and IIa fibers vs A-AL (Fig. 2E). Interestingly, O-CR displayed higher type IIa fiber size vs O-AL indicating that CR attenuated the effect of aging on type IIa fiber size (Fig. 2E). In the GAS, no difference in type I and IIa fiber sizes were observed across our groups (Fig. 2F).

However, type IIx and IIb were significantly smaller in O-AL and O-CR vs A-AL (Fig. 2E).

In the SOL, the proportion of type I and type IIa fibers were respectively higher and lower in O-AL and O-CR vs A-AL (Fig. 2G). Interestingly, the proportion of type I and IIa fibers were respectively lower and higher in the SOL of O-CR vs O-AL (Fig. 2G). In the GAS, O-AL displayed significantly higher type I and IIx fiber proportion, and lower type IIb proportion vs A-AL (Fig. 2H). Importantly, O-CR displayed significantly lower type I and IIx fiber proportion, and higher type IIb fiber proportion vs O-AL (Fig. 2H). Furthermore, no difference in fiber type proportion were observed between O-CR and A-AL (Fig. 2H).

Altogether, these data indicate that caloric restriction attenuates the effects of aging on muscle fiber type composition.

Effects of aging on skeletal muscle mitochondrial content and succinate dehydrogenase activity

To assess the effects of aging and CR on skeletal muscle mitochondrial content, we quantified on longitudinal TEM images the mitochondrial density in the SOL and GAS (Fig. 3A). As expected, mitochondrial volume density was higher in the SOL vs GAS in all groups (Fig. 3B). Interestingly, no difference in mitochondrial volume density was observed between A-AL, O-AL and O-CR in both muscles (Fig. 3B). These results indicate that neither aging nor CR affected mitochondrial content. To assess the impact of aging on mitochondrial enzyme activity, we quantified the activity of the Krebs cycle enzyme SDH *in situ* on muscle cross-sections (Fig. 3C). As shown in Fig. 3D, both O-AL and O-CR displayed a lower SDH activity in the SOL vs A-AL. Similarly, O-AL displayed a lower SDH activity in the GAS vs A-AL (Fig. 3C). However, the SDH activity measured in the GAS of O-CR rats was significantly higher than the one of O-AL and similar to the one of A-AL (Fig. 3C).

Effects of aging and caloric restriction on skeletal muscle mitochondrial morphology

To define the impact of aging and CR on mitochondrial morphology, shape descriptors were determined from TEM images acquired in both longitudinal and transversal orientations for the 2 populations of mitochondria found in skeletal muscle: subsarcolemmal (SS) and intermyofibrillar (IMF) mitochondria. To specifically assess the effects of aging on mitochondrial morphological complexity, we also plotted the aspect ratio and form factor values for all individual SS and IMF mitochondria. We then determined in A-AL and O-AL and O-CR the proportion of mitochondria that were below the 25th percentile of adult values for both aspect ratio and form factor (morphologically simple). Similarly, we determined in A-AL, O-AL and O-CR the proportion of mitochondria that were above the 75th percentile of adult values for both aspect ratio and form factor (morphologically complex).

Effects of aging and CR on mitochondrial morphology in the oxidative SOL muscle

When analyzed in longitudinal orientation, SOL muscles from O-AL contained SS mitochondria with significantly lower area, perimeter and minimum Feret's diameter, than their younger counterparts (Table 1 and Fig. 4A). The proportion of SS mitochondria with small aspect ratio and form factor values was also increased in O-AL vs A-AL (Fig. 4A). SOL from O-CR displayed SS mitochondria with significantly higher area, perimeter and minimum Feret's diameter vs O-AL (Table 1 and Fig. 4A). Interestingly, no differences in the distribution of mitochondrial shape descriptors were observed between SS mitochondria from O-CR and A-AL in the SOL in longitudinal orientation (Fig. 4A).

In transversal orientation, no significant difference in area, perimeter and minimum Feret diameter were observed between SS mitochondria from O-AL and A-

AL SOL (Fig. 4B). However, SS mitochondria from O-AL SOL displayed significantly higher average circularity value (Table 1), a shift to right of the circularity distribution and a shift to the left of the distribution of Form factor and aspect ratio values vs A-AL (Fig. 4B). As compared to O-AL, SOL from O-CR displayed SS mitochondria with lower average circularity values, higher average form factor (Table 1), as well as a shift to the left of the circularity distribution and a shift to the right of the distribution of Form factor values (Fig. 4B).

In both transversal and longitudinal orientations, O-AL displayed an increase in the proportion of morphologically simple mitochondria vs A-AL, a difference attenuated in O-CR animals (Fig. 4C and B). Taken altogether, the data indicate that aging is associated with a fragmentation of SS mitochondria in the SOL. They also indicate that CR attenuates the effects of aging on SS morphology in the SOL.

As shown in Fig. 5 and table 1, the average values and frequency distribution of all of the shape descriptors quantified indicate that SOL IMF mitochondria from O-AL rats are fragmented compared to A-AL animals. These data also indicate that CR attenuated aging-related fragmentation of IMF mitochondria in the SOL.

Effects of aging and CR on mitochondrial morphology in the glycolytic WG muscle

In both longitudinal and transversal orientations, SS mitochondria from O-AL animals displayed significantly higher area, perimeter and minimum Feret's diameter vs A-AL (Figure 6A and B and Table 2). In addition, SS mitochondria from O-AL animals displayed significantly higher aspect ratio and form factor values, as well as a shift to the right of the circularity distribution in both orientation vs A-AL in longitudinal orientation (Fig. 6A and Table 2). These data associated, with the respective increase and decrease in the proportion of complex and simple SS mitochondria in the WG of O-AL vs A-AL (Fig. 6C and D) indicate that old animal

display enlarged and more complex SS mitochondria in the WG. As can be seen in Fig. 6, as well as in Table 2, CR had marginal anti-aging effects on SS mitochondrial morphology in the WG.

When we analyzed in longitudinal orientation, IMF mitochondria from O-AL rats displayed significantly higher area, perimeter, aspect ratio, form factor and minimum Feret diameter vs A-AL (Fig. 7A and Table 2) and lower circularity values vs A-AL (Fig. 7A and Table 2). CR did not attenuate the effects of aging of these shape descriptors in longitudinal orientation, CR even exacerbated the differences between O-AL and A-AL (Fig. 7A and Table 2). In contrast to data obtained in longitudinal orientation, IMF mitochondria from O-AL rats in transversal orientation displayed significantly lower area, perimeter and minimum Feret diameter vs A-AL (Fig. 7A and Table 2). However, IMF mitochondria from O-AL rats in transversal orientation displayed higher form factor values and complex shifts in the distribution of aspect ratio and form factor values vs A-AL (Fig. 7A and Table 2). In line with data obtained in longitudinal orientation, data in transversal orientation indicate that CR did not attenuate the effects of aging of all shape descriptors and even exacerbated some differences between O-AL and A-AL (Fig. 7B and Table 2). As shown in Fig. 7C and D, IMF mitochondria from O-AL rats displayed a higher proportion of morphologically complex mitochondria, especially in longitudinal orientation (Fig. 7C). Again, CR has marginal anti-aging effects on the morphological complexity of IMF mitochondrial in the WG (Fig. 7C and D).

Overall, these results indicate that aged WG muscles display a higher proportion of enlarged and less circular SS mitochondria and a higher proportion of more complex, elongated and branched mitochondria. They also indicate that CR exerted minor to no anti-aging effect on mitochondrial morphology in the WG.

Effects of aging and caloric restriction on immunoreactive levels of proteins regulating mitochondrial dynamics

With the aim of getting a better insight into potential mechanisms underlying the changes in mitochondrial morphology observed in O-AL and O-CR rat skeletal muscles, we next quantified the content of key proteins regulating mitochondrial dynamics.

As shown in Fig. 8A and B, the immunoreactive levels of the pro-fission protein Drp1 were significantly higher in the SOL O-AL vs A-AL, while no difference was observed between O-AL and A-AL for the contents of Mfn2 and Fis1. Surprisingly, O-CR displayed higher Drp1 content vs A-AL (Fig. 8A and B). While no difference was observed between O-CR and A-AL for Fis1 content, the content of Mfn2 was significantly higher in the SOL of O-CR vs A-AL (Fig. 8A and B).

In the GAS, O-AL displayed significantly higher Mfn2, Drp1, and Fis1 protein levels vs A-AL (Fig. 8A and C). Protein contents of Mfn2 and Fis1 were also higher in the GAS of O-AL vs O-CR (Fig. 8A and C). The WG of O-CR displayed higher contents of Drp1 vs A-AL rats (Fig. 8A and C). No difference in Mfn2 and Fis1 contents were observed in the GAS of O-CR vs A-AL rats (Fig. 8A and C).

Taken altogether, our data indicate that the effects of aging and CR on the content of proteins regulating mitochondrial dynamics are complex and muscle specific.

3.6 Discussion

The aim of the present study was to define the impacts of aging and calorie restriction on mitochondrial morphology and dynamics in oxidative and glycolytic muscles. In the present manuscript, we first show CR attenuated the impact of aging

on muscle mass to body weight ratio, a sarcopenic index. We also provide evidence that CR abolished the effects of aging on muscle fiber type composition in both types of muscle. To assess the impacts of aging and calorie restriction on mitochondrial morphology, we used a quantitative 2-dimensional electron microscopy approach to evaluate the morphology of the two populations of skeletal muscle mitochondria, IMF and SS, in the SOL and WG muscles. Using this approach, we show that aging in the SOL is associated with a fragmentation of SS and IMF mitochondria. We also show that CR attenuated this aging-related fragmentation of SS and IMF mitochondria in the SOL. In contrast, our data indicate that aging in the highly glycolytic white gastrocnemius (WG) is associated with an enlargement of SS mitochondria and an increase in the complexity and branching of IMF mitochondria. We finally show that the effects of aging and CR on the content of proteins regulating mitochondrial dynamics are complex and muscle specific.

Effects of aging and caloric restriction on skeletal muscle mass and phenotype

Although CR did not attenuate the effect of aging on skeletal muscle mass, it fully prevented the impact of aging on the muscle weight to body weight ratio, a widely used index of sarcopenia [28-30]. The preservation of this index suggest that CR attenuated the impact of aging on animal mobility and functional capacities. Interestingly, and although no effect of CR was observed in muscle fiber size, CR also totally prevented the impact of aging on muscle fiber type composition. Indeed, and in line with previous reports on the impact of aging on rat skeletal muscle phenotype [31, 32], O-AL rats displayed an increase in type IIa fiber proportion in the SOL and a shift towards more oxidative fibers in the GAS. In contrast, no difference in muscle fiber type composition was observed between O-CR and A-AL. The current theory explaining the progressive remodeling of muscle fiber type composition occurring in aging is based on the fact that skeletal muscle fibers

undergo progressive cycles of denervation and reinnervation with age. This theory, supported by ample scientific evidence (see [33] for a detailed review), implicates that some fibers will lose their innervation, due to impaired neuromuscular integrity, before being re-innervated by axonal sprouting from an adjacent motor neuron. This process is believed to progressively remodel muscle fiber type composition with age, and atrophy is thought to occur when the rate of denervation outpaces the rate of reinnervation. The absence of difference in muscle fiber type composition in O-CR vs A-AL SOL suggests that CR might protect the integrity of neuromuscular junctions (NMJ) during the aging process. This is in line with the results from Valdez et al., showing that CR significantly reduced the incidence of NMJ abnormalities in 24-month-old mice and attenuated aging-related loss of motor neurons [34].

Effects of aging and caloric restriction on mitochondrial content

The impact of aging on muscle mitochondrial content remains a controversial topic, with some studies showing reduced mitochondrial content in aged skeletal muscle [35-38] and others reporting no effect of aging [39-42]. The present study supports the view that aging is not associated with a decline in mitochondrial content since no difference in mitochondrial density, which was assessed here using the gold standard approach (i.e. assessed on TEM images), was not reduced in both the SOL and of O-AL rats. However, we found that O-AL animals display a decrease in SDH activity in both the SOL and GAS muscles, suggesting that although mitochondrial content was preserved in muscle of O-AL rats, mitochondrial bioenergetics might be impaired in old muscles. Interestingly, and although CR has been proposed to increase mitochondrial content [43], no impact of CR on mitochondrial density could be evidenced in the present study. The absence of effect of CR on mitochondrial content in aged skeletal muscle is in line with recent studies from the Holloszy and Nair research groups which have shown that CR does not increase mitochondrial

content in rodent skeletal muscle [12, 44]. Interestingly, Nair et al., have also shown that CR attenuates the effects of aging on state 3 (ADP-stimulated) mitochondrial respiration in the GAS. This result is in line with our present finding showing that CR attenuates the effect of aging on the SDH activity in the GAS. The present results show that CR did not protect against the effects of aging on SDH activity in the SOL, indicating that not all muscles are protected from the decline in mitochondrial function with CR. The mechanism underlying the differential effect of CR on SDH activity in the SOL and GAS requires further study.

Effects of aging and caloric restriction on mitochondrial morphology and dynamics

Few studies have investigated the effects of aging on mitochondrial morphology in skeletal muscle and have retrieved controversial data. While some studies have provided data suggesting that aging is associated with a fragmentation of IMF mitochondria [12, 45-47], others have provided data indicating that aging is associated with an increased branching and morphological complexity of IMF mitochondria, an enlargement of SS mitochondria [41], and an increase in mitochondrial fusion [41, 48]. Importantly, all studies reporting an aging-related decrease in IMF mitochondrial size only assessed mitochondrial morphology in longitudinal orientation. Sectioning skeletal muscle in the transverse orientation is however essential to accurately quantify IMF mitochondrial morphology [22, 26]. This is because IMF mitochondria are tubular and branched structures that align along the sarcomeric plan (in transverse orientation) [22], which essentially appear as round structures when visualized in longitudinal orientation [33]. In addition, to our knowledge, no previous study has compared the impact of aging, and CR, on both oxidative and glycolytic muscles. The latter point is particularly important since mitochondrial function is well known to differ between oxidative and glycolytic

muscles [49]. It is therefore possible that mitochondrial morphology, and the impact of aging and CR, might also differ between oxidative and glycolytic muscles. Taking these factors into consideration, the present study is to date the most thorough investigation of mitochondrial morphology in the context of aging, since multiple representative shape descriptors were quantified in longitudinal and transverse orientations for both SS and IMF mitochondria and in both glycolytic and oxidative muscles. It is therefore possible that the opposite effects we report here of aging on mitochondrial morphology (i.e. fragmentation of SS and IMF mitochondria in the SOL and enlargement of SS mitochondria and an increase in the complexity and branching of IMF mitochondria in the WG) might account for some of the discrepancy currently present in the literature. In addition, our results highlight that while CR seems to protect from the effect of aging on mitochondrial morphology in the SOL, it had minor to no anti-aging effect on mitochondrial morphology in the glycolytic WG.

Our data on mitochondrial dynamics indicates that aging in the SOL is associated with an increase in the content of the pro-fission protein Drp1, a result consistent with the increased in mitochondrial fragmentation we observed in this oxidative muscle. Although CR did not attenuate the effects of aging on Drp1 content in the SOL, it was associated with an increased in the content of pro-fusion protein Mfn2. This increase in Mfn2 content seen in the SOL of O-CR animals might be involved in the protective effects of CR against the aging-related increase in mitochondrial fragmentation in the SOL. The enlargement of SS mitochondria and the increase in the complexity and branching of IMF mitochondria seen in the WG of O-AL rats were associated with an increase in Mfn2 as well as an increase in the pro-fission protein Drp1 and Fis1. While the higher content of Mfn2 is in line with our morphological data and previous studies that have suggested an increase in mitochondrial fusion in aged muscle [41, 48], the concomitant increase in Drp1 and Fis1 also suggest an increase in mitochondrial fission in the WG of aged rats. This

concomitant increase in the expression of both pro-fusion and pro-fission proteins might reflect an attempt to compensate for an aging-related accumulation of mitochondrial dysfunction by i) increasing fusion to mix the matrix content of healthy mitochondria with the one of dysfunctional mitochondrial [24] and ii) increase fission to segregate the most dysfunctional mitochondria to ultimately degrade them through autophagy [50]. Whether these speculations are true, or whether these changes are causally involved in the accumulation of mitochondrial dysfunction require further mechanistic study to investigate the impact of modulating both mitochondrial fusion and fission processes on skeletal muscle aging. Interestingly, while CR did not attenuate the effect of aging on mitochondrial morphology, it did attenuate the impact of aging on the expression of some proteins regulating mitochondrial dynamics. These findings, associated with our data showing that CR attenuated the aging-related decline in SDH activity in the GAS, could suggest that the CR-induced decrease in Mfn2 and Fis1 content might have played a protective role against the aging-related decrease in SDH activity.

3.7 Conclusions

In conclusion, the present manuscript provides evidence that aging related skeletal muscle atrophy is associated with i) a fragmentation of SS and IMF mitochondria in the oxidative SOL, (ii) an enlargement of SS mitochondria and an increase in the complexity and branching of IMF mitochondria in the glycolytic WG, (iii) an increase in the content of the pro-fission protein Drp1 in the SOL and (iv) an increase in the content of Drp1, Fis1 and Mfn2 in the GAS. We also show that CR i) abolished the effects of aging on muscle fiber type composition in both the SOL and GAS muscle, (ii) attenuated the aging-related fragmentation of SS and IMF mitochondria in the SOL, (ii) did not attenuate the effects of aging on mitochondrial morphology in the WG, (iii) did not attenuate the increase in Drp1 but increased Mfn2 content in the

SOL and (iv) attenuated the effects of aging on Mfn2 and Fis1 contents in the GAS. Taken altogether, our results clearly highlight the fact that the effects of aging and CR on mitochondrial morphology and dynamics are extremely complex and muscle specific.

3.8 Acknowledgements

This work was funded by a discovery grant from the Natural Sciences and Engineering Council of Canada (NSERC) awarded to Gilles Gouspillou (#RGPIN-2014-04668). Gilles Gouspillou is the recipient of a *Chercheur Boursier Junior 1* salary award from *Fonds de recherche du Québec-Santé* (FRQS-35184). The authors are grateful to the QNRA, a network financially supported by FRQS, for providing O-AL and O-CR rats.

3.9 References

1. Rosenberg, I.H., *Sarcopenia: origins and clinical relevance*. J Nutr, 1997. **127**(5 Suppl): p. 990S-991S.
2. Dirks, A.J. and C. Leeuwenburgh, *The role of apoptosis in age-related skeletal muscle atrophy*. Sports Med, 2005. **35**(6): p. 473-83.
3. Gouspillou, G., et al., *Alteration of mitochondrial oxidative phosphorylation in aged skeletal muscle involves modification of adenine nucleotide translocator*. Biochim Biophys Acta, 2010. **1797**(2): p. 143-51.
4. Drew, B. and C. Leeuwenburgh, *Method for measuring ATP production in isolated mitochondria: ATP production in brain and liver mitochondria of Fischer-344 rats with age and caloric restriction*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2003. **285**(5): p. R1259-67.
5. Short, K.R., et al., *Decline in skeletal muscle mitochondrial function with aging in humans*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(15): p. 5618-23.
6. Gouspillou, G., et al., *Mitochondrial energetics is impaired in vivo in aged skeletal muscle*. Aging Cell, 2014. **13**(1): p. 39-48.
7. Dirks, A. and C. Leeuwenburgh, *Apoptosis in skeletal muscle with aging*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2002. **282**(2): p. R519-27.
8. Marzetti, E., et al., *Age-related activation of mitochondrial caspase-independent apoptotic signaling in rat gastrocnemius muscle*. Mech Ageing Dev, 2008. **129**(9): p. 542-9.
9. Umanskaya, A., et al., *Genetically enhancing mitochondrial antioxidant activity improves muscle function in aging*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014. **111**(42): p. 15250-5.
10. Gouspillou, G. and R.T. Hepple, *Facts and controversies in our understanding of how caloric restriction impacts the mitochondrion*. Exp Gerontol, 2013. **48**(10): p. 1075-84.
11. Asami, D.K., et al., *Effect of aging, caloric restriction, and uncoupling protein 3 (UCP3) on mitochondrial proton leak in mice*. Exp Gerontol, 2008. **43**(12): p. 1069-76.

12. Lanza, I.R., et al., *Chronic caloric restriction preserves mitochondrial function in senescence without increasing mitochondrial biogenesis*. Cell Metab, 2012. **16**(6): p. 777-88.
13. Hepple, R.T., et al., *Long-term caloric restriction abrogates the age-related decline in skeletal muscle aerobic function*. FASEB J, 2005. **19**(10): p. 1320-2.
14. Hepple, R.T., et al., *Caloric restriction protects mitochondrial function with aging in skeletal and cardiac muscles*. Rejuvenation Res, 2006. **9**(2): p. 219-22.
15. Wohlgemuth, S.E., et al., *Skeletal muscle autophagy and apoptosis during aging: effects of calorie restriction and life-long exercise*. Exp Gerontol, 2010. **45**(2): p. 138-48.
16. Chen, H., A. Chomyn, and D.C. Chan, *Disruption of fusion results in mitochondrial heterogeneity and dysfunction*. The Journal of biological chemistry, 2005. **280**(28): p. 26185-92.
17. Yu, T., et al., *Mitochondrial fission mediates high glucose-induced cell death through elevated production of reactive oxygen species*. Cardiovascular research, 2008. **79**(2): p. 341-51.
18. Ong, S.B., et al., *Inhibiting mitochondrial fission protects the heart against ischemia/reperfusion injury*. Circulation, 2010. **121**(18): p. 2012-22.
19. Gomes, L.C., G. Di Benedetto, and L. Scorrano, *During autophagy mitochondria elongate, are spared from degradation and sustain cell viability*. Nature cell biology, 2011. **13**(5): p. 589-98.
20. Jahani-Asl, A., et al., *Mitofusin 2 protects cerebellar granule neurons against injury-induced cell death*. The Journal of biological chemistry, 2007. **282**(33): p. 23788-98.
21. Benard, G., et al., *Mitochondrial bioenergetics and structural network organization*. Journal of cell science, 2007. **120**(Pt 5): p. 838-48.
22. Ogata, T. and Y. Yamasaki, *Ultra-high-resolution scanning electron microscopy of mitochondria and sarcoplasmic reticulum arrangement in human red, white, and intermediate muscle fibers*. The Anatomical record, 1997. **248**(2): p. 214-23.

23. Chan, D.C., *Mitochondrial fusion and fission in mammals*. Annual review of cell and developmental biology, 2006. **22**: p. 79-99.
24. Chen, H., et al., *Mitochondrial fusion is required for mtDNA stability in skeletal muscle and tolerance of mtDNA mutations*. Cell, 2010. **141**(2): p. 280-9.
25. Picard, M., et al., *Acute exercise remodels mitochondrial membrane interactions in mouse skeletal muscle*. J Appl Physiol (1985), 2013. **115**(10): p. 1562-71.
26. Picard, M., K. White, and D.M. Turnbull, *Mitochondrial morphology, topology, and membrane interactions in skeletal muscle: a quantitative three-dimensional electron microscopy study*. J Appl Physiol (1985), 2013. **114**(2): p. 161-71.
27. Rivero-Gutierrez, B., et al., *Stain-free detection as loading control alternative to Ponceau and housekeeping protein immunodetection in Western blotting*. Anal Biochem, 2014. **467**: p. 1-3.
28. Paturi, S., et al., *Effects of aging and gender on muscle mass and regulation of Akt-mTOR-p70s6k related signaling in the F344BN rat model*. Mech Ageing Dev, 2010. **131**(3): p. 202-9.
29. Edstrom, E., et al., *Atrogin-1/MAFbx and MuRF1 are downregulated in aging-related loss of skeletal muscle*. J Gerontol A Biol Sci Med Sci, 2006. **61**(7): p. 663-74.
30. Ezzat-Zadeh, Z., et al., *The Cooccurrence of Obesity, Osteoporosis, and Sarcopenia in the Ovariectomized Rat: A Study for Modeling Osteosarcopenic Obesity in Rodents*. J Aging Res, 2017. **2017**: p. 1454103.
31. Rowan, S.L., et al., *Denervation causes fiber atrophy and myosin heavy chain co-expression in senescent skeletal muscle*. PLoS One, 2012. **7**(1): p. e29082.
32. Rowan, S.L., et al., *Accumulation of severely atrophic myofibers marks the acceleration of sarcopenia in slow and fast twitch muscles*. Exp Gerontol, 2011. **46**(8): p. 660-9.
33. Gouspillou, G., et al., *Role of peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha (PGC-1alpha) in denervation-induced atrophy in aged muscle: facts and hypotheses*. Longev Healthspan, 2013. **2**(1): p. 13.

34. Valdez, G., et al., *Attenuation of age-related changes in mouse neuromuscular synapses by caloric restriction and exercise*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(33): p. 14863-8.
35. Conley, K.E., S.A. Jubrias, and P.C. Esselman, *Oxidative capacity and ageing in human muscle*. J Physiol, 2000. **526 Pt 1**: p. 203-10.
36. Chabi, B., et al., *Mitochondrial function and apoptotic susceptibility in aging skeletal muscle*. Aging Cell, 2008. **7**(1): p. 2-12.
37. Lanza, I.R. and K.S. Nair, *Muscle mitochondrial changes with aging and exercise*. Am J Clin Nutr, 2009. **89**(1): p. 467S-71S.
38. Crane, J.D., et al., *The effect of aging on human skeletal muscle mitochondrial and intramyocellular lipid ultrastructure*. J Gerontol A Biol Sci Med Sci, 2010. **65**(2): p. 119-28.
39. St-Jean-Pelletier, F., et al., *The impact of ageing, physical activity, and pre-frailty on skeletal muscle phenotype, mitochondrial content, and intramyocellular lipids in men*. J Cachexia Sarcopenia Muscle, 2017. **8**(2): p. 213-228.
40. Gouspillou, G., et al., *Increased sensitivity to mitochondrial permeability transition and myonuclear translocation of endonuclease G in atrophied muscle of physically active older humans*. FASEB J, 2014. **28**(4): p. 1621-33.
41. Leduc-Gaudet, J.P., et al., *Mitochondrial morphology is altered in atrophied skeletal muscle of aged mice*. Oncotarget, 2015. **6**(20): p. 17923-37.
42. Russ, D.W. and J.A. Kent-Braun, *Is skeletal muscle oxidative capacity decreased in old age?* Sports Med, 2004. **34**(4): p. 221-9.
43. Guarente, L., *Mitochondria--a nexus for aging, calorie restriction, and sirtuins?* Cell, 2008. **132**(2): p. 171-6.
44. Hancock, C.R., et al., *Does calorie restriction induce mitochondrial biogenesis? A reevaluation*. FASEB J, 2011. **25**(2): p. 785-91.
45. Huang, J.H., et al., *Effect of age on the processing and import of matrix-destined mitochondrial proteins in skeletal muscle*. J Gerontol A Biol Sci Med Sci, 2010. **65**(2): p. 138-46.

46. Iqbal, S., et al., *Expression of mitochondrial fission and fusion regulatory proteins in skeletal muscle during chronic use and disuse*. Muscle Nerve, 2013. **48**(6): p. 963-70.
47. Poggi, P., C. Marchetti, and R. Scelsi, *Automatic morphometric analysis of skeletal muscle fibers in the aging man*. Anat Rec, 1987. **217**(1): p. 30-4.
48. Picca, A., et al., *Mitochondrial dynamics signaling is shifted toward fusion in muscles of very old hip-fractured patients: Results from the Sarcopenia in Hip FracTure (SHIFT) exploratory study*. Exp Gerontol, 2017. **96**: p. 63-67.
49. Picard, M., R.T. Hepple, and Y. Burelle, *Mitochondrial functional specialization in glycolytic and oxidative muscle fibers: tailoring the organelle for optimal function*. Am J Physiol Cell Physiol, 2012. **302**(4): p. C629-41.
50. Twig, G., et al., *Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy*. EMBO J, 2008. **27**(2): p. 433-46.

3.9 Figures legends

Figure 1: Effect of aging and caloric restriction body weight and muscles weight. A. Whole body weights and B. TA, SOL, GAS, EDL, PL muscles weights. C. and % of body weight of adults (A-AL, $n=9$), old ad libitum (O-AL, $n=4$) and old CR rats (O-CR, $n=11$). Data represented mean $\pm$ SEM. *: $p < 0.05$.

Figure 2: Effect of aging and caloric restriction on fiber cross-sectional area and fibers type.

A. Representative immunolabeling of type I (blue), type IIa (red) and type IIb (green) myosin heavy chains (MHCs) performed on muscle cross section of SOL (left) and GAS (right) muscles from A-AL. B. Average fiber size of the SOL and WG of A-AL, O-AL, O-CR rats. C. and D. Fiber size distribution in the SOL (C.) and GAS (D.) of A-AL, O-AL and O-CR rats. E. and F. Muscle fiber type composition in SOL (E.) and GAS (F.) of A-AL, O-AL and O-CR rats. Scale bars: 1000 μ m. Data in graphs are presented as Mean $\pm$ SEM. $N = 6$ per group. *: $p < 0.05$. Data in graphs C and D *: $p < 0.05$ A-AL vs O-AL, ■ : $p < 0.05$ A-AL vs O-CR, • : $p < 0.05$ O-AL vs O-CR.

Figure 3: Effects of aging on skeletal muscle mitochondrial content. A. Representative longitudinal TEM images of A-AL, O-AL and O-CR that were used for the quantification of mitochondrial volume density. The results of these quantifications for the SOL and WG are presented in B ($n = 4$ in each group). C. Representative succinate dehydrogenase (SDH) stain of SOL and GAS cross-sections of A-AL, O-AL and O-CR. D. Quantification of the SDH stain intensity in the SOL and GAS of all groups (A-AL, $N=7-8$; O-AL, $N=4$ and O-CR, $N=7-8$). Data in graphs are presented as Mean $\pm$ SEM. Scale bars in A: 2 μ m.

Figure 4: Effects of aging and caloric restriction on the morphology of subsarcolemmal (SS) mitochondria in the oxidative SOL muscle. Analyses of

morphological parameters of mitochondria SS in soleus muscle (longitudinal and transversal orientation). **A.** and **B.** Frequency distribution of shape descriptors and morphological for SS mitochondria in longitudinal (A) and transversal orientations (B). **C.** and **D.** display the form factor and aspect ratio relationship for individual SS mitochondria for A-AL (left graph), O-AL (middle graph) and O-CR (right graph) rats in longitudinal (C) and transversal orientations (D). In **C.** and **D.**, blue and red dashed lines represent the 25th and 75th percentiles for either aspect ratio or form factor values of A-AL, respectively. The pie charts in the second line represent the percentage of mitochondria with simple (i.e. mitochondria with aspect ratio and form factors values inferior to the 25th percentile of A-AL values), complex (i.e. mitochondria with aspect ratio and form factors values above the 75th percentile of A-AL values) and intermediate (i.e. neither simple nor complex). Differences in frequency distributions were tested using a Kolmogorov-Smirnov test comparing cumulative distributions.

Figure 5: Effects of aging and caloric restriction on the morphology of intermyofibrillar (IMF) mitochondria in the oxidative SOL muscle. Analyses of morphological parameters of mitochondria IMF in the SOL muscle (longitudinal and transversal orientation). **A.** and **B.** Frequency distribution of shape descriptors and morphological for IMF mitochondria in longitudinal (A) and transversal orientations (B). **C.** and **D.** display the form factor and aspect ratio relationship for individual IMF mitochondria for A-AL (left graph), O-AL (middle graph) and O-CR (right graph) rats in longitudinal (C) and transversal orientations (D). In **C.** and **D.**, blue and red dashed lines represent the 25th and 75th percentiles for either aspect ratio or form factor values of A-AL, respectively. The pie charts in the second line represent the percentage of mitochondria with simple (i.e. mitochondria with aspect ratio and form factors values inferior to the 25th percentile of A-AL values), complex (i.e. mitochondria with aspect ratio and form factors values above the 75th percentile of A-AL values) and intermediate (i.e. neither simple nor complex). Differences in

frequency distributions were tested using a Kolmogorov-Smirnov test comparing cumulative distributions.

Figure 6: Effects of aging and caloric restriction on the morphology of subsarcolemmal (SS) mitochondria in the glycolytic white gastrocnemius (WG) muscle. Analyses of morphological parameters of mitochondria SS in WG muscle (longitudinal and transversal orientation). **A.** and **B.** Frequency distribution of shape descriptors and morphological for SS mitochondria in longitudinal (**A**) and transversal orientations (**B**). **C.** and **D.** display the form factor and aspect ratio relationship for individual SS mitochondria for A-AL (left graph), O-AL (middle graph) and O-CR (right graph) rats in longitudinal (**C**) and transversal orientations (**D**). In **C.** and **D.**, blue and red dashed lines represent the 25th and 75th percentiles for either aspect ratio or form factor values of A-AL, respectively. The pie charts in the second line represent the percentage of mitochondria with simple (i.e. mitochondria with aspect ratio and form factors values inferior to the 25th percentile of A-AL values), complex (i.e. mitochondria with aspect ratio and form factors values above the 75th percentile of A-AL values) and intermediate (i.e. neither simple nor complex). Differences in frequency distributions were tested using a Kolmogorov-Smirnov test comparing cumulative distributions.

Figure 7: Effects of aging and caloric restriction on the morphology of intermyofibrillar (IMF) mitochondria in the glycolytic white gastrocnemius (WG) muscle. Analyses of morphological parameters of mitochondria IMF in WG muscle (longitudinal and transversal orientations). **A.** and **B.** Frequency distribution of shape descriptors and morphological for IMF mitochondria in longitudinal (**A**) and transversal orientations (**B**). **C.** and **D.** display the form factor and aspect ratio relationship for individual IMF mitochondria for A-AL (left graph), O-AL (middle graph) and O-CR (right graph) rats in longitudinal (**C**) and transversal orientations (**D**). In **C.** and **D.**, blue and red dashed lines represent the 25th and 75th percentiles

for either aspect ratio or form factor values of A-AL, respectively. The pie charts in the second line represent the percentage of mitochondria with simple (i.e. mitochondria with aspect ratio and form factors values inferior to the 25th percentile of A-AL values), complex (i.e. mitochondria with aspect ratio and form factors values above the 75th percentile of A-AL values) and intermediate (i.e. neither simple nor complex). Differences in frequency distributions were tested using a Kolmogorov-Smirnov test comparing cumulative distributions.

Figure 8: Effects of skeletal muscle aging and caloric restriction on immunoreactive levels of proteins regulating mitochondrial dynamics in oxidative and glycolytic muscles. A. Representative immunoblots of Mfn2, Drp1, Fis1 as well as their corresponding stains free images. **B-C.** Quantification of Mfn2, Drp1, Fis1 proteins contents (normalized to their corresponding to their stain free intensity) in the SOL (B) and GAS (C) of adult (A-AL), old ad libitum-fed (O-AL) and old CR (O-CR) rats. Data in graphs are presented as Mean $\pm$ SEM. ($n = 7-8$ A-AL, $n=4$ O-AL, $n=8-10$ O-CR per group. $*= p < 0.05$).

Figure 1

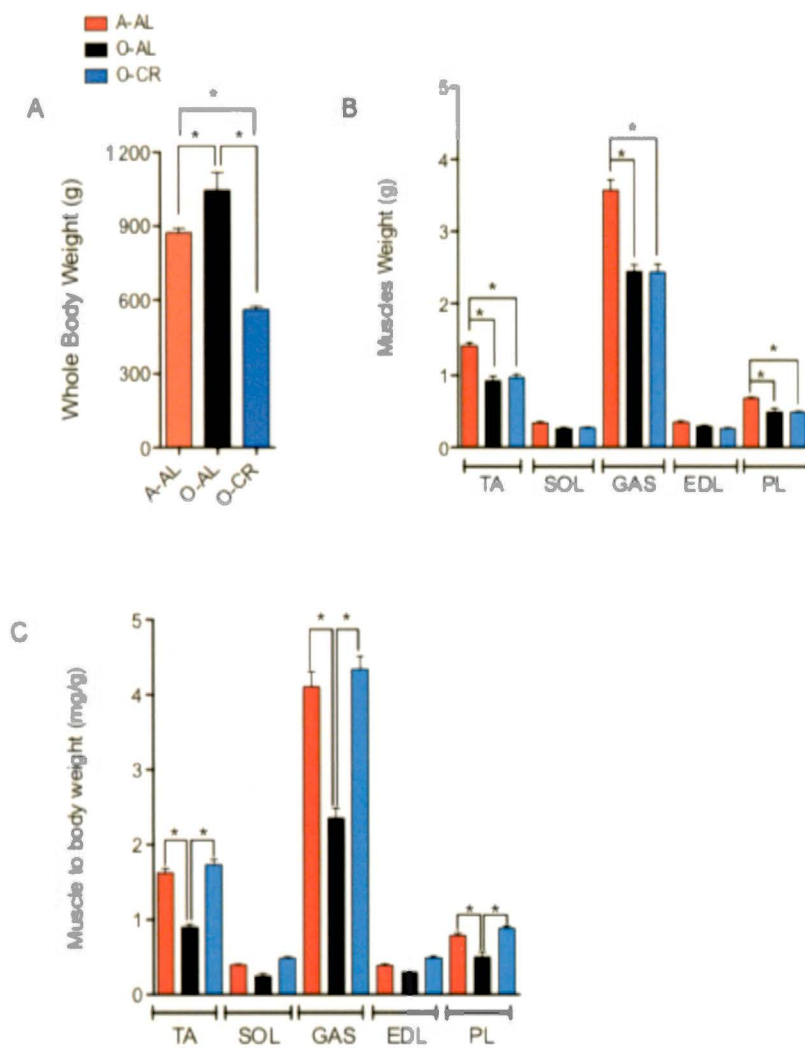


Figure 2

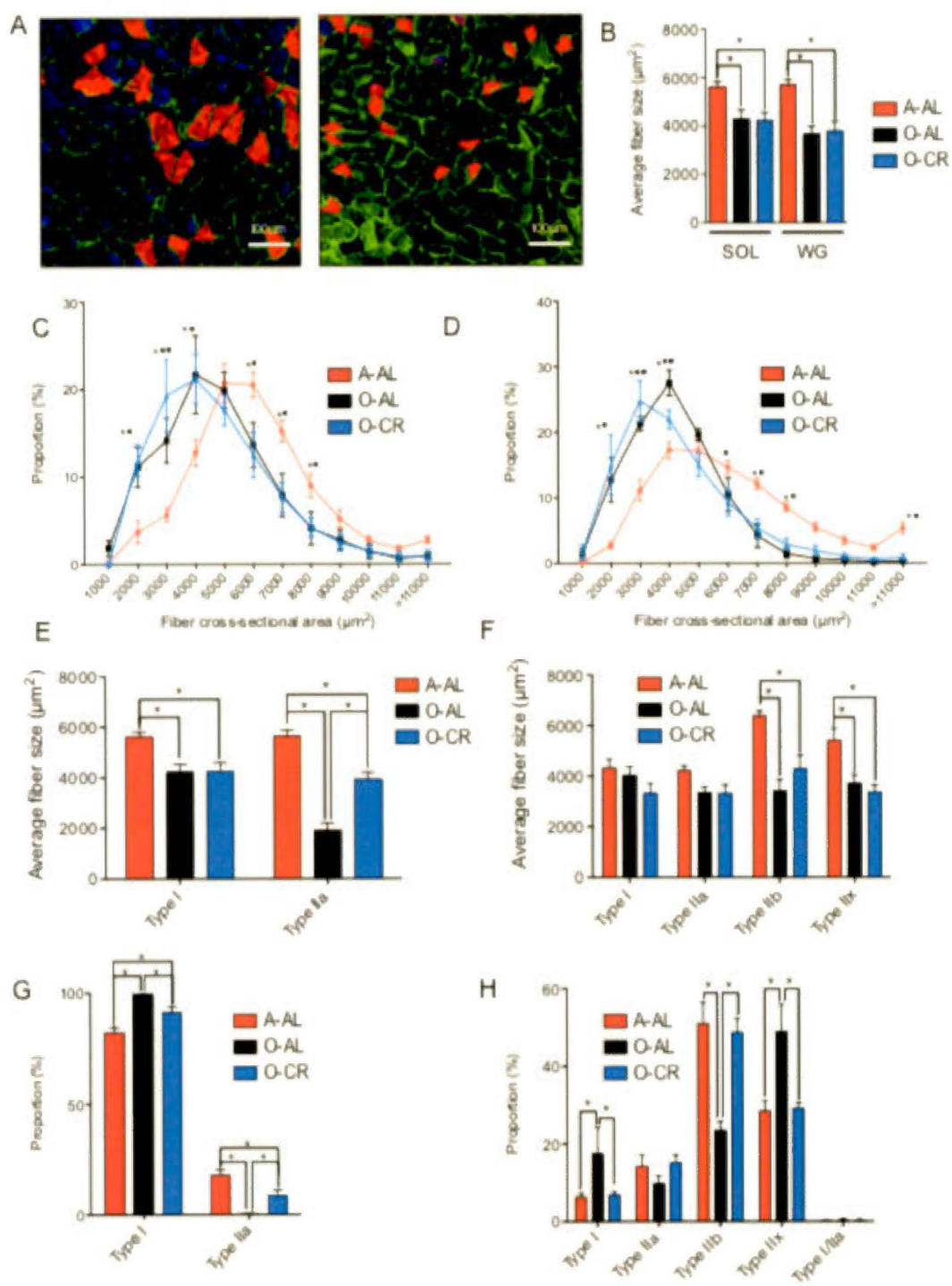


Figure 3

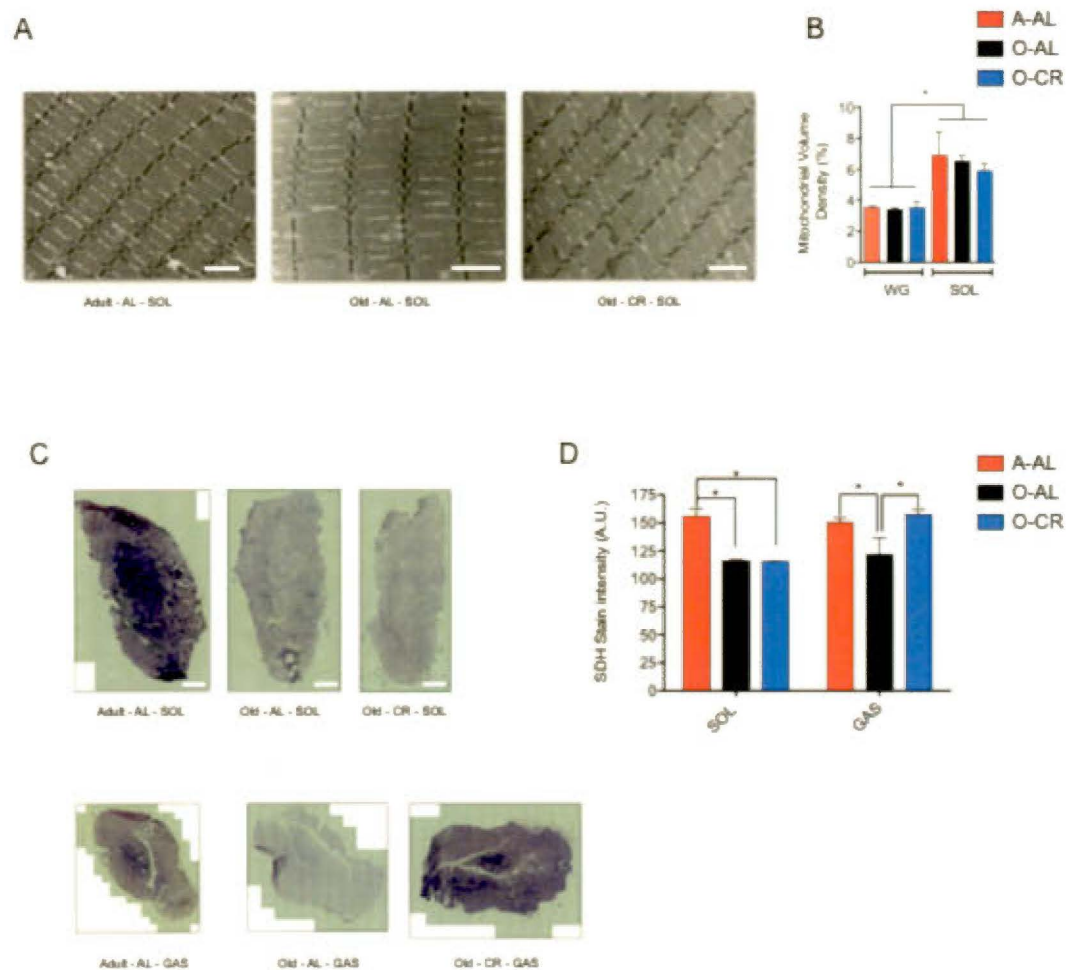


Figure 4

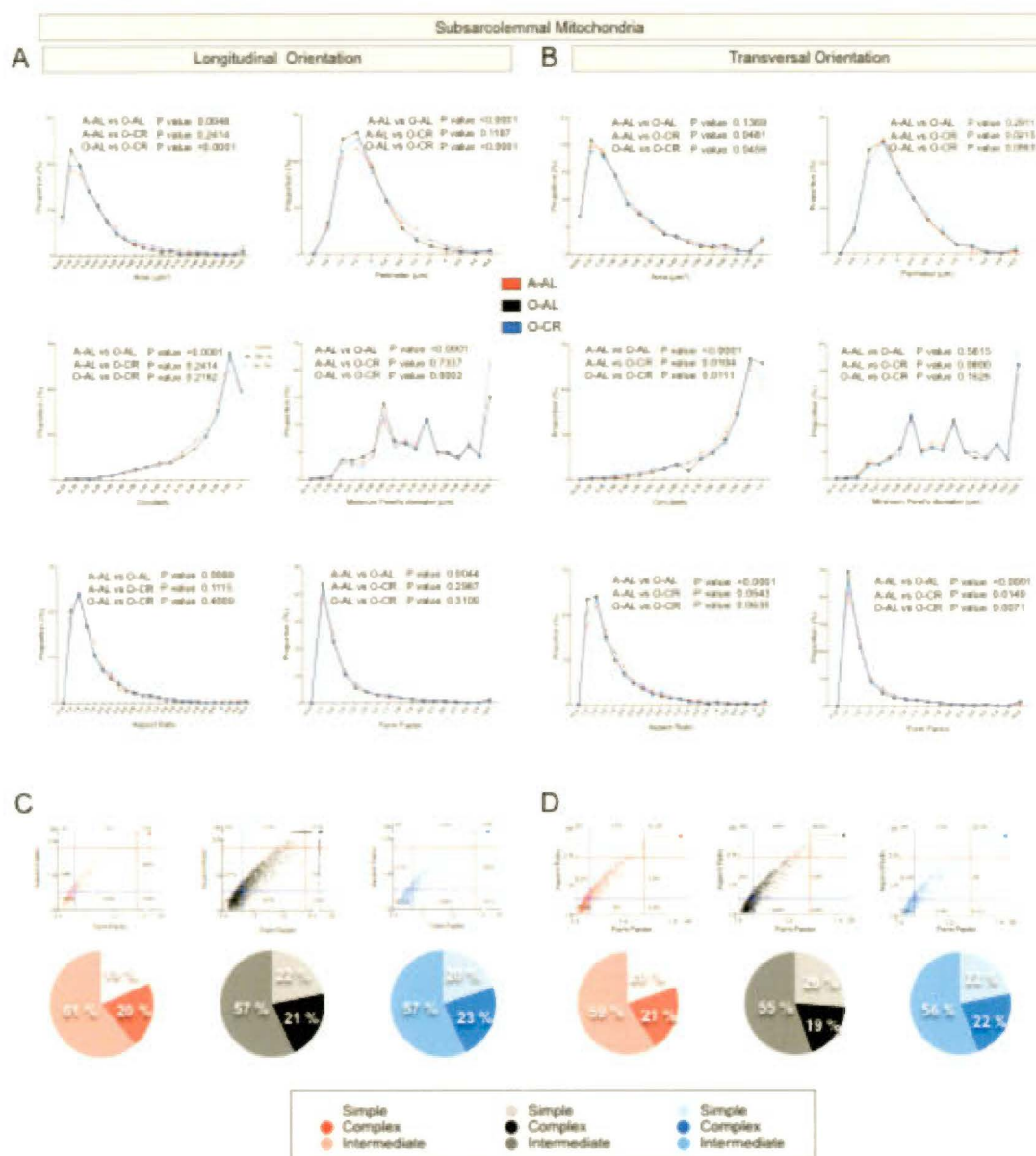


Figure 5

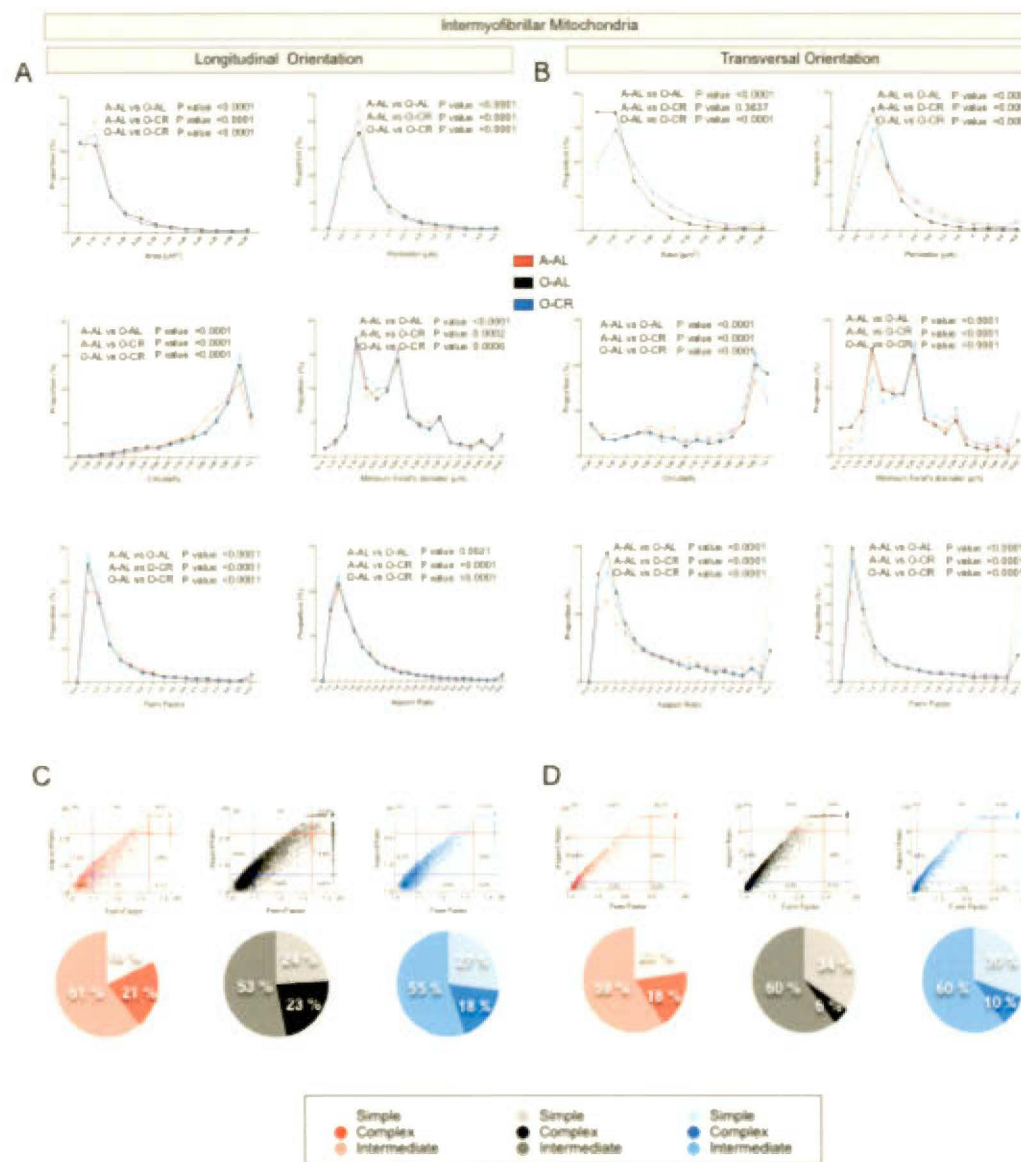


Figure 6

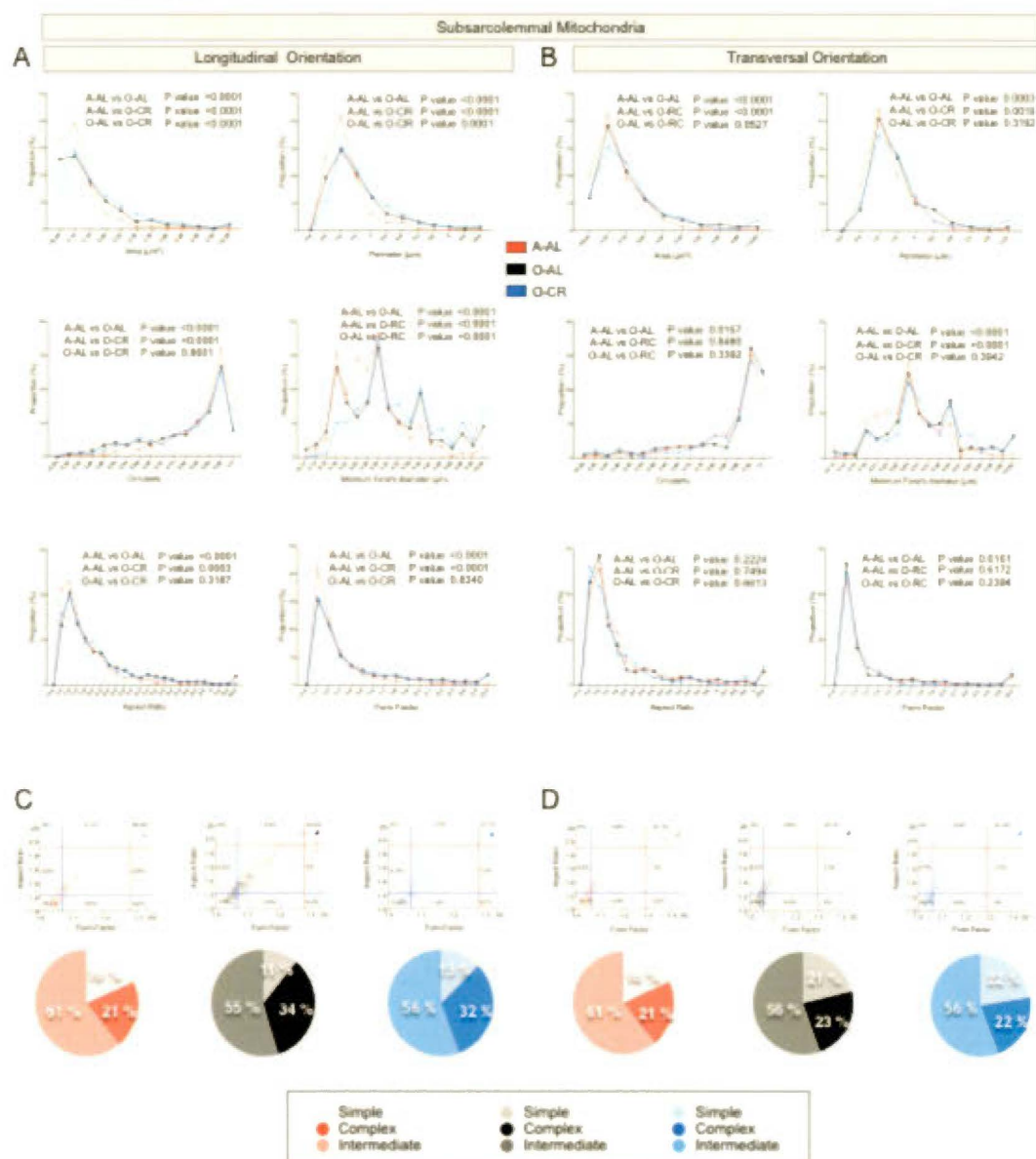


Figure 7

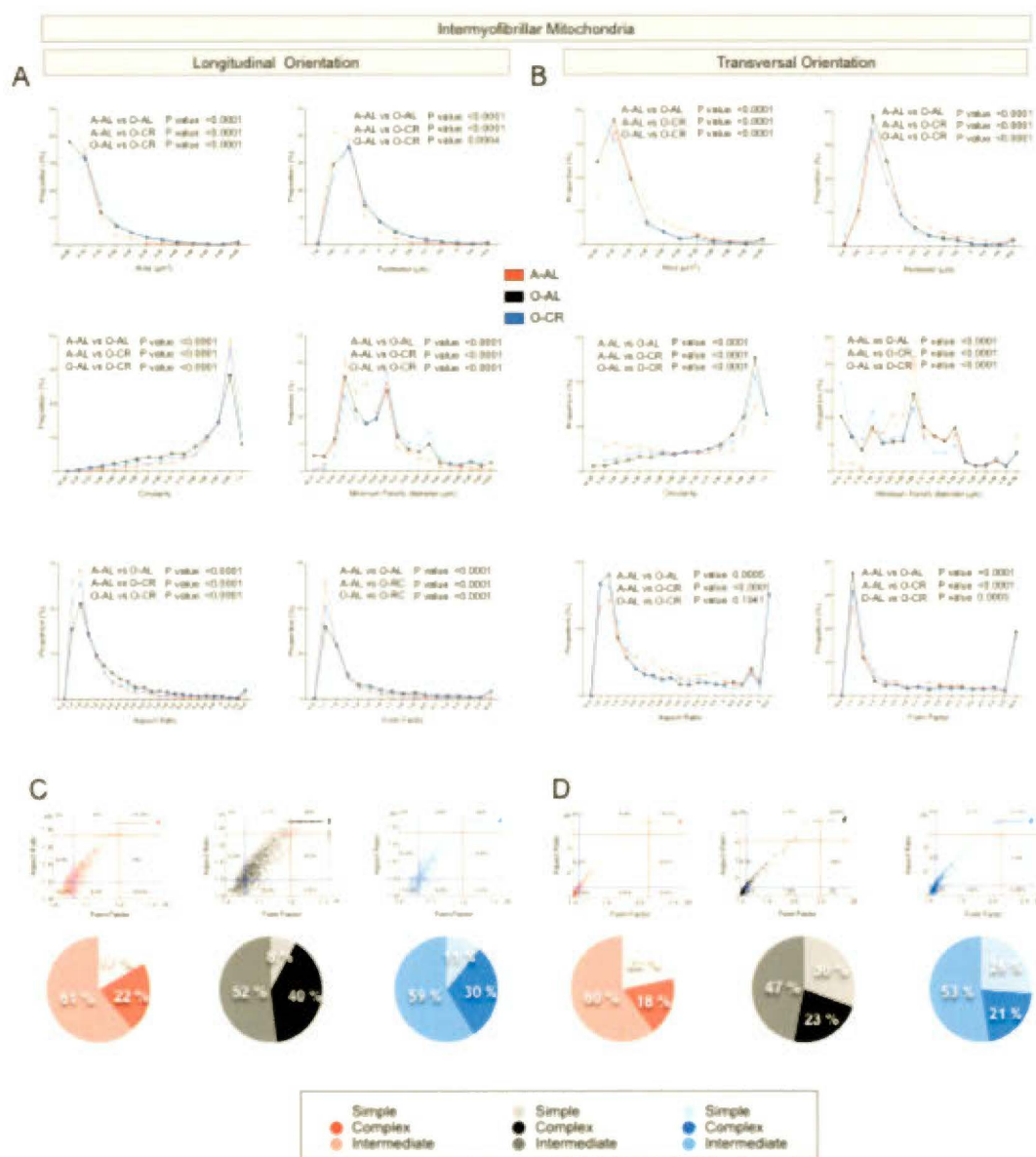


Figure 8

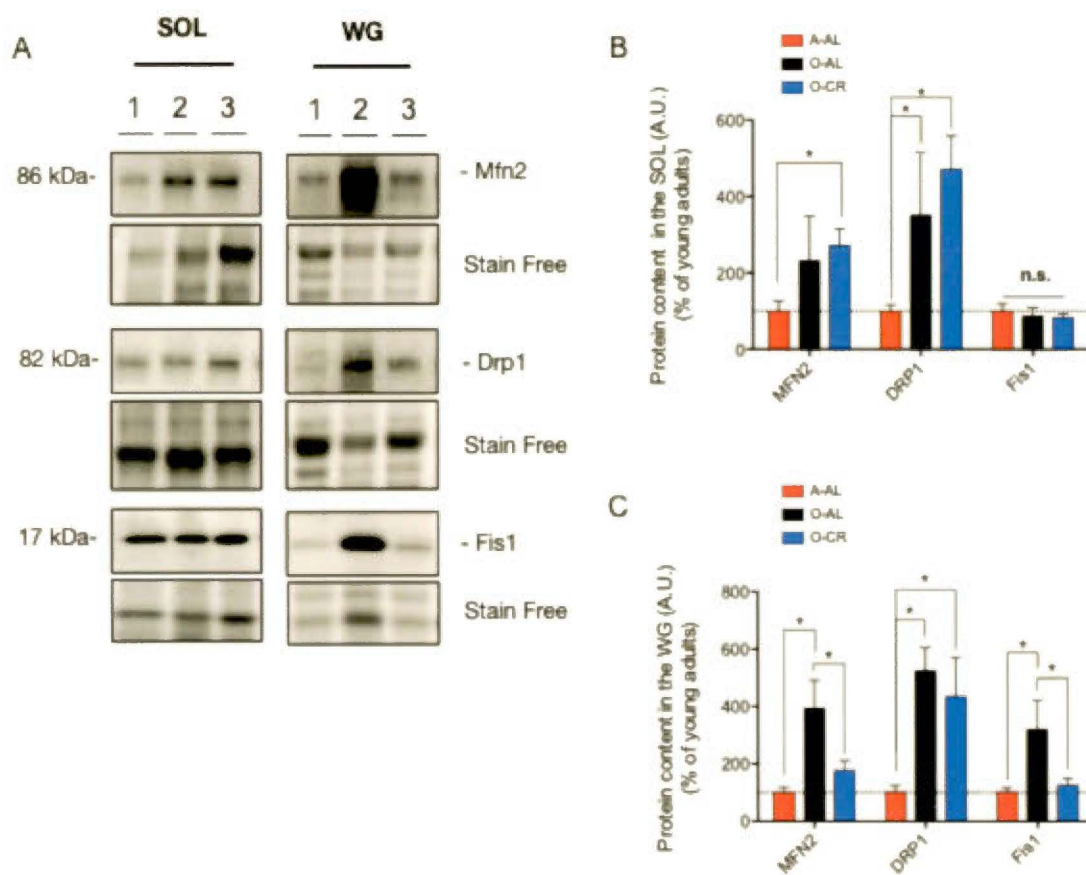


Table 1: Effects of aging and caloric restriction on morphological parameters and shape descriptors of subsarcolemmal and intermyofibrillar mitochondria in the soleus

SOLEUS							
	SS	Longitudinal Orientation			Transverse Orientation		
		A-AL	O-AL	O-RC	A-AL	O-AL	O-RC
N		1612	4746	1359	1993	1880	1143
Area (um ²)		0.25 ± 0.006 ^{ab}	0.19 ± 0.002 ^{ac}	0.23 ± 0.006 ^{bc}	0.22 ± 0.004	0.22 ± 0.005	0.24 ± 0.007
Perimeter (μm)		1.81 ± 0.022 ^a	1.64 ± 0.011 ^{ac}	1.76 ± 0.023 ^c	1.73 ± 0.017	1.72 ± 0.018	1.82 ± 0.026
Circularity		0.84 ± 0.003	0.84 ± 0.002	0.84 ± 0.004	0.84 ± 0.003 ^a	0.85 ± 0.003 ^{ac}	0.83 ± 0.005 ^c
Aspect Ratio		1.71 ± 0.017	1.69 ± 0.010	1.70 ± 0.018	1.75 ± 0.017	1.68 ± 0.017	1.76 ± 0.025
Form Factor		1.24 ± 0.007	1.25 ± 0.005	1.25 ± 0.008	1.25 ± 0.007	1.22 ± 0.008 ^c	1.27 ± 0.011 ^c
Minimum Feret (μm)		0.42 ± 0.005 ^a	0.38 ± 0.002 ^{ac}	0.41 ± 0.005 ^c	0.40 ± 0.004	0.41 ± 0.004	0.42 ± 0.005
IMF							
N		3955	8487	6101	3189	7138	3962
Area (um ²)		0.10 ± 0.002 ^a	0.11 ± 0.001 ^{ac}	0.1 ± 0.001 ^c	0.14 ± 0.002 ^{ab}	0.09 ± 0.001 ^{ac}	0.15 ± 0.002 ^{bc}
Perimeter (μm)		1.21 ± 0.009 ^a	1.26 ± 0.008 ^{ac}	1.18 ± 0.008 ^c	1.78 ± 0.021 ^{ab}	1.24 ± 0.009 ^{ac}	1.67 ± 0.019 ^{bc}
Circularity		0.81 ± 0.002 ^b	0.81 ± 0.002 ^c	0.83 ± 0.002 ^{bc}	0.64 ± 0.005 ^{ab}	0.77 ± 0.002 ^{ac}	0.72 ± 0.004 ^{bc}
Aspect Ratio		1.84 ± 0.013 ^{ab}	1.89 ± 0.011 ^{ac}	1.76 ± 0.010 ^{bc}	3.02 ± 0.035 ^{ab}	2.17 ± 0.016 ^{ac}	2.50 ± 0.028 ^{bc}
Form Factor		1.28 ± 0.005 ^{ab}	1.31 ± 0.004 ^{ac}	1.26 ± 0.004 ^{bc}	1.99 ± 0.021 ^{ab}	1.45 ± 0.008 ^{ac}	1.68 ± 0.017 ^{bc}
Minimum Feret (μm)		0.26 ± 0.002	0.27 ± 0.001	0.26 ± 0.001	0.28 ± 0.002 ^{ab}	0.25 ± 0.001 ^{ac}	0.30 ± 0.002 ^{bc}

Data were obtained from adult ad libitum-fed (A-AL, N=4), old ad libitum-fed (O-AL, N=4) and old CR rats (O-CR, N=4). a: p<0,05 A-AL vs O-AL; b: p<0,05 A-AL vs O-CR; c: p<0,05 O-AL vs O-CR. Data are presented as mean ± SEM.

Table 2: Effects of aging and caloric restriction on morphological parameters and shape descriptors of subsarcolemmal and intermyofibrillar mitochondria in the white gastrocnemius.

WHITE GASTROCNEMIUS							
		Longitudinal Orientation			Transverse Orientation		
		A-AL	O-AL	O-RC	A-AL	O-AL	O-RC
SS							
N		610	1010	559	502	390	117
Area (um ²)		0.08 ± 0.003 ^{ab}	0.14 ± 0.005 ^{ac}	0.16 ± 0.006 ^{bc}	0.10 ± 0.003 ^{ab}	0.13 ± 0.005 ^a	0.13 ± 0.010 ^b
Perimeter (μm)		1.12 ± 0.019 ^{ab}	1.43 ± 0.026 ^{ac}	1.59 ± 0.037 ^{bc}	1.25 ± 0.026 ^a	1.39 ± 0.034 ^a	1.34 ± 0.054
Circularity		0.84 ± 0.005 ^{ab}	0.77 ± 0.006 ^a	0.78 ± 0.007 ^b	0.83 ± 0.007	0.83 ± 0.009	0.84 ± 0.015
Aspect Ratio		1.69 ± 0.027 ^{ab}	2.02 ± 0.034 ^{ac}	1.89 ± 0.038 ^{bc}	1.82 ± 0.047	1.88 ± 0.070	1.73 ± 0.090
Form Factor		1.23 ± 0.011 ^{ab}	1.39 ± 0.015 ^a	1.37 ± 0.020 ^b	1.28 ± 0.019	1.31 ± 0.028	1.28 ± 0.048
Minimum Feret (μm)		0.26 ± 0.003 ^{ab}	0.29 ± 0.004 ^{ac}	0.33 ± 0.005 ^{bc}	0.27 ± 0.003 ^{ab}	0.31 ± 0.006 ^a	0.32 ± 0.007 ^b
IMF							
N		2326	3724	1566	972	1352	2119
Area (um ²)		0.07 ± 0.001 ^{ab}	0.10 ± 0.002 ^{ac}	0.12 ± 0.003 ^{bc}	0.14 ± 0.004 ^{ab}	0.11 ± 0.003 ^{ac}	0.10 ± 0.002 ^{bc}
Perimeter (μm)		1.00 ± 0.010 ^{ab}	1.21 ± 0.011 ^{ac}	1.30 ± 0.020 ^{bc}	1.73 ± 0.035 ^{ab}	1.48 ± 0.027 ^{ac}	1.31 ± 0.019 ^{bc}
Circularity		0.86 ± 0.003 ^{ab}	0.79 ± 0.003 ^{ac}	0.82 ± 0.004 ^{bc}	0.68 ± 0.008	0.69 ± 0.007	0.70 ± 0.005
Aspect Ratio		1.63 ± 0.017 ^{ab}	1.97 ± 0.017 ^{ac}	1.81 ± 0.026 ^{bc}	2.68 ± 0.054 ^a	2.96 ± 0.07 ^a	2.83 ± 0.049
Form Factor		1.21 ± 0.006 ^{ab}	1.36 ± 0.007 ^{ac}	1.31 ± 0.011 ^{bc}	1.78 ± 0.029	1.86 ± 0.035	1.81 ± 0.025
Minimum Feret (μm)		0.23 ± 0.001 ^{ab}	0.25 ± 0.001 ^{ac}	0.28 ± 0.003 ^{bc}	0.30 ± 0.005 ^{ab}	0.27 ± 0.004 ^{ac}	0.24 ± 0.003 ^{bc}

Data are presented as mean ± SEM. Data were obtained from adult ad libitum-fed (A-AL, N=4), old ad-libitum fed (O-AL, N=4) and old CR rats (O-CR, N=4). a: p<0,05 A-AL vs O-AL; b: p<0,05 A-AL vs O-CR; c: p<0,05 O-AL vs O-CR.

CHAPITRE IV

DISCUSSION

Le but de ce projet de maîtrise était d'étudier les effets du vieillissement et de la RC sur la morphologie et la dynamique des mitochondries dans le muscle squelettique oxydatif (SOL) et glycolytique (WG) du rat, deux muscles qui possèdent des caractéristiques typologiques et métabolique très distinctes. En effet le SOL est composé de fibres lentes oxydatives contenant beaucoup de mitochondries, comparativement au WG qui lui est majoritairement composés de fibres rapides glycolytiques. Nos résultats démontrent un impact positif de la RC sur les effets du vieillissement musculaire en préservant notamment le poids des muscles normalisés par le poids corporel, un indice de sarcopénie. De plus, la RC a également aboli les effets du vieillissement sur la typologie musculaire dans les deux types de muscles. Afin de quantifier la morphologie des deux populations de mitochondries des muscles squelettiques, IMF et SS, dans le SOL et WG, nous avons utilisé une approche de microscopie électronique bidimensionnelle quantitative. La robustesse de cette étude résulte en l'utilisation du TEM dans les deux orientations transversale et longitudinale, qui nous permet d'avoir une vision globale de la complexité des mitochondries (Picard *et al.*, 2013b). L'utilisation de deux types de muscles au sein de ce projet est primordiale, car la littérature actuelle tire des conclusions globales par l'étude d'un seul muscle squelettique. Bien que le WG ait un contenu en mitochondries relativement faible par rapport au soléaire, ces deux muscles étaient idéaux pour étudier les effets du vieillissement musculaire et de la RC sur la morphologie et la dynamique mitochondriale. Nos principaux résultats démontrent que dans le SOL le vieillissement est associé à une fragmentation des mitochondries SS et IMF, et que la RC atténue cet effet lié au vieillissement. En contraste, le vieillissement dans le WG est associé à un élargissement des mitochondries SS et à

une augmentation de la complexité et de la ramification des mitochondries du IMF. La RC n'a pas atténué les effets du vieillissement sur la morphologie mitochondriale dans le WG. Enfin, nous montrons que les effets de la RC sur le contenu des protéines régulant la dynamique mitochondriale sont complexes et spécifiques aux muscles.

4.1 Impact du vieillissement et de la restriction calorique sur la masse et le phénotype musculaire au sein de muscles glycolytique et oxydatif

À l'heure actuelle, la littérature démontre que le vieillissement est associé une augmentation de l'atrophie musculaire et une augmentation de la masse corporelle (Lexell *et al.*, 1988). Nous avons également confirmé au sein de notre étude que le poids des animaux augmente avec le vieillissement, comparativement à leurs jeunes homologues, mais celui-ci diminue logiquement en condition de RC. Il est intéressant de noter que la masse musculaire, telle qu'émise dans nos hypothèses, fut diminuée chez les rats âgés *ad libitum*, mais que les rats âgés sous RC n'ont pas subi de perte de masse musculaire supplémentaire. Enfin, nous avons mesuré un indice de sarcopénie, qui consiste au ratio du poids total de l'animal sur le poids des muscles, nous indiquant ainsi que le muscle âgé est sarcopénique. En contraste, la préservation de cet indice suggère nettement que la RC atténue l'impact du vieillissement sur les capacités fonctionnelles et mobilité des animaux. Outre l'atteinte de la masse musculaire au cours du vieillissement, la sarcopénie est associée à des modifications du tissu musculaire et notamment la taille des fibres (Lexell *et al.*, 1988). Les résultats de cette étude démontrent dans les deux muscles étudiés (SOL et WG) une diminution de la taille moyenne des fibres des groupes O-AL et O-CR comparativement à leurs jeunes homologues. Cependant la typologie des fibres musculaires, a été nettement préservée des effets du vieillissement avec la RC, ne montrant aucune différence avec leurs jeunes homologues (A-AL). Une partie de la littérature évoque une diminution de la taille et de la proportion de fibres de type IIa, de par un shift du phénotype musculaire vers les fibres lentes de type I avec le vieillissement (Clark & Taylor, 2011; Coggan *et al.*, 1992; Fayet *et al.*, 2001; Frontera *et al.*, 2000; Jakobsson *et al.*, 1990; Janssen *et al.*, 2000; Lexell, 1995; Lexell *et al.*, 1988; Verdijk *et al.*, 2007). Les rats O-AL présentaient une atteinte plus spécifique des types de fibres IIa au sein du SOL et une atteinte des types IIb, IIa au

sein du WG. Ces modifications spécifiques à un type de fibres au sein du muscle oxydatif et glycolytique peuvent s'expliquer par le remodelage lié à l'âge des unités motrices. Cela résulte principalement de la dénervation des fibres musculaires de types II par opposition à une réinnervation des fibres de type I (D'Antona *et al.*, 2003; Delbono, 2011; Kostek & Delmonico, 2011). En effet, avec le vieillissement, il y a une diminution du nombre d'unités motrices, ce qui entraîne une modification de la typologie musculaire et donc, une atteinte du recrutement de ces unités motrices (Lexell *et al.*, 1988). Par conséquent, l'absence de différence entre nos groupes YA-AL et O-CR dans les deux muscles suggérerait que la RC protège les jonctions neuromusculaires au cours du vieillissement, préservant ainsi les types de fibres affectées au cours du vieillissement. Cette suggestion coïncide avec l'étude de Valdez *et al.*, qui ont montré sur des modèles de souris âgées de 24 mois en restriction calorique il y avait une atténuation des changements liés à l'âge dans les synapses neuromusculaires de souris (Valdez *et al.*, 2010). La composition des types de fibres musculaires peut changer en réponse à divers stimuli externes d'une manière spécifique aux types de fibres. En effet, les fibres de types I sont plus sujettes à l'inactivité et à l'atrophie induites par la dénervation, alors que les fibres de type II sont plus touchées par les pathologies telles que le diabète, les problèmes cardiaques, le cancer et le vieillissement (Wang & Pessin, 2013).

4.2 Impact du vieillissement et de la restriction calorique sur la densité mitochondriale au sein de muscles glycolytique et oxydatif

Il n'y a à l'heure actuelle pas de consensus clair sur l'impact du vieillissement sur la densité mitochondriale. En effet, alors que certaines études ont rapporté une diminution du contenu en mitochondries dans les muscles âgés (Chabi *et al.*, 2008; Lanza *et al.*, 2012; Short *et al.*, 2005; Terman *et al.*, 2010), d'autres n'ont trouvé aucun effet du vieillissement (Gouspillou *et al.*, 2014b; Leduc-Gaudet *et al.*, 2015). Nous avons donc voulu déterminer les effets du vieillissement et de la RC sur la

densité mitochondriale par une analyse quantitative au moyen de la Microscopie Électronique à Transmission (MET). La présente étude ne montre aucune différence de densité mitochondriale entre les groupes O-AL et A-AL à la fois dans le SOL et dans le WG, soutenant donc la littérature indiquant que le vieillissement n'est pas associé à une diminution de la densité mitochondriale (Gouspillou *et al.*, 2014b; Leduc-Gaudet *et al.*, 2015). Cependant, nous avons trouvé une diminution de l'activité SDH (le complexe II de la chaîne de transfert des électrons mitochondriale) avec le vieillissement dans les muscles SOL et GAS des groupes O-AL. Ce résultat suggère ainsi que malgré une préservation de la densité mitochondriale, la bioénergétique mitochondriale dans les muscles des rats O-AL pourrait être altérée. De manière intéressante, alors que la RC n'a pas affecté le contenu en mitochondries, elle a cependant atténué l'effet du vieillissement sur l'activité SDH dans le GAS. Ces résultats sont en lien avec ceux obtenus par Lanza *et al.* qui ont montré que la RC chez la souris atténue les effets du vieillissement sur la capacité oxydative et l'efficacité des mitochondries sans augmentation de la densité mitochondriale (Lanza *et al.*, 2012). Cependant aucune différence n'a été observée au sein du SOL, ne démontrant donc aucun effet protecteur contre les effets néfastes du vieillissement sur l'activité SDH. La RC joue donc un rôle différent sur l'activité mitochondriale dans les deux types de muscles. Cela nous permet donc de conclure que la densité mitochondriale ne change certes pas en fonction des différentes conditions, à l'inverse de l'activité mitochondriale. Une étude plus approfondie sur ce sujet serait nécessaire afin de comprendre l'impact de l'activité mitochondriale sur ces deux types de muscles avec le vieillissement et la RC.

4.3 Impact du vieillissement et de la restriction calorique sur la morphologie mitochondriale au sein de muscles glycolytique et oxydatif

Dans le muscle squelettique, la morphologie mitochondriale est complexe allant des petits organites individuels à des réseaux réticulaires étendus (Picard *et al.*, 2011a). Peu d'études descriptives sont disponibles dans la littérature sur les effets du vieillissement et de la RC sur la morphologie mitochondriale. Une altération de la morphologie mitochondriale est constatée au sein de diverses pathologies comme l'obésité (Bach *et al.*, 2005), le diabète (Fujimaki & Kuwabara, 2017), mais aussi le vieillissement (Huang *et al.*, 2010; Leduc-Gaudet *et al.*, 2015). Notre présente étude est la première à fournir une description exhaustive des effets du vieillissement et de la RC sur la morphologie des mitochondries dans deux types de muscles et dans deux orientations différentes. Il est important de le mentionner, car beaucoup d'études ont évalué la morphologie mitochondriale dans une orientation, longitudinale. Or l'orientation transversale est nécessaire à la quantification morphologique des mitochondries, surtout les mitochondries IMF, car elles sont bien plus complexes et ramifiées que les mitochondries SS (Picard *et al.*, 2013c). De plus, aucune étude n'a comparé la morphologie mitochondriale dans deux types de muscles, malgré que les fonctions mitochondriales diffèrent dans un type de muscle glycolytique et oxydatif (Picard *et al.*, 2012). Tout en sachant que la morphologie et la fonction mitochondriale sont interconnectées, il est possible que l'impact du vieillissement et de la RC sur la morphologie mitochondriale au sein de ces deux types de muscles diffère. En effet, nos résultats démontrent une atteinte de la morphologie avec le vieillissement qui est différente au sein des deux types de muscle. Dans le SOL le vieillissement est associé à une fragmentation des mitochondries SS et IMF en orientation transversale et longitudinale. Cette fragmentation est atténuée par la RC au travers des deux orientations. Au sein du WG âgé, celui-ci présentait un élargissement des mitochondries SS et une augmentation de la complexité des mitochondries IMF par rapport aux jeunes rats en orientation longitudinale et

transversale. Cependant, en orientation transversale, la taille des mitochondries IMF diminuait légèrement. Contrairement au soléaire âgé, RC n'a pas affecté la morphologie des mitochondries SS et IMF dans le gastrocnémien blanc âgé. Fait intéressant, le vieillissement musculaire est connu pour avoir un impact différentiel sur le fonctionnement des mitochondries SS et IMF. En effet, Chabi *et al.*, ont démontré que les mitochondries SS sont plus affectées par le processus de vieillissement, présentant un plus grand désaccouplement, une perte significative du potentiel membranaire et une augmentation plus importante de leur susceptibilité à déclencher l'apoptose par rapport aux mitochondries IMF (Chabi *et al.*, 2008). De même, certains modèles cellulaires démontrent justement qu'une fragmentation des mitochondries augmenterait les altérations de ces fonctions telles que la diminution de la respiration, l'augmentation de la production de RLDO et la sensibilisation du PTPm (Chen *et al.*, 2005b; Gomes *et al.*, 2011b; Ong *et al.*, 2010). Au contraire, un allongement des mitochondries peut améliorer leurs fonctions, notamment en diminuant la production d'espèces réactives de l'oxygène, augmentant la respiration et en réduisant la sensibilité de l'ouverture du PTPm (Gomes *et al.*, 2011b; Ong *et al.*, 2010). Cependant, il a également été rapporté qu'un allongement excessif des mitochondries pouvait également être négatif pour les fonctions mitochondriales (Seo *et al.*, 2010; Terman *et al.*, 2005). Nos résultats montrant des changements différentiels au travers de ces deux sous populations de mitochondries pourraient potentiellement expliquer l'impact du vieillissement sur les fonctions de ces deux populations mitochondriales dans les muscles squelettiques. Une morphologie trop complexe, trop large ou ramifiée pourrait aussi avoir des effets néfastes à l'égard de la fonction mitochondriale (Leduc-Gaudet *et al.*, 2015; Seo *et al.*, 2010; Terman *et al.*, 2010). En outre, nos résultats soulignent que si la RC semble protéger de l'effet du vieillissement sur la morphologie mitochondriale dans le SOL, l'effet anti-vieillessement est quant à lui minime à nul sur la morphologie mitochondriale dans WG.

4.4 Impact du vieillissement et de la restriction calorique sur la dynamique mitochondriale au sein de muscles glycolytique et oxydatif.

Après avoir quantifié la morphologie mitochondriale au sein de nos différents groupes, nos données de MET laissaient présager une dynamique opposée dans nos deux types de muscles. En effet, nos résultats démontrent une augmentation de l'expression de la protéine de fission Drp1 dans le SOL des rats O-AL, un résultat cohérent avec la fragmentation mitochondriale observée en morphologie dans ce muscle. Or la RC n'a pas atténué les effets du vieillissement sur le contenu en Drp1 dans le SOL, mais elle est accompagnée d'une augmentation du contenu en protéine de fusion Mfn2. Cette augmentation est également en lien avec les résultats observés en MET suggérant ainsi des effets protecteurs de la RC vis à vis du vieillissement en atténuant cette fragmentation mitochondriale dans le SOL. Concernant le Gas âgé, nos résultats montrent une augmentation de Mfn2 associée à une augmentation des protéines de fission Drp1 et Fis1. Or la RC, contrairement à son effet sur la morphologie mitochondriale dans le Gas, atténue l'impact du vieillissement sur l'expression des protéines régulant la dynamique mitochondriale dans ce muscle.

Il est possible que l'augmentation de l'expression de Drp1 dans les muscles SOL âgés ait un effet délétère sur le fonctionnement mitochondrial. En effet, plusieurs études réalisées sur des cultures cellulaires ont démontré qu'une fragmentation excessive des mitochondries peut induire des dysfonctions mitochondriales (Chen *et al.*, 2005b; Ong *et al.*, 2010 ; Gomes *et al.*, 2011b; Picard *et al.*, 2013b). Cependant, il est également possible que cette augmentation de Drp1 soit un mécanisme compensatoire visant à séparer les fragments de mitochondries endommagées pour qu'ils puissent être dégradés par mitophagie (Picard *et al.*, 2013b). De même, l'augmentation de l'expression de Mfn2 dans les Gas âgés, associée à l'augmentation de la complexité des mitochondries pourrait représenter un mécanisme compensatoire visant à faire fusionner des mitochondries partiellement dysfonctionnelles avec des mitochondries

saines dans le but d'échanger leur contenu et de restaurer les fonctions des fragments endommagés (Chan, 2006). Il est également possible qu'un réseau complexe dans le Gas âgé puisse interférer avec la mitophagie. En effet, cette dernière nécessite la fission des mitochondries pour qu'elles puissent être dégradées. Un réseau trop complexe pourrait donc diminuer le renouvellement des mitochondries et contribuer aux dysfonctions mitochondriales.

Les données disponibles à l'heure actuelle dans la littérature concernant les effets du vieillissement sur la morphologie et la dynamique des mitochondries sont contradictoires. En effet, alors que certaines études ont rapporté des données suggérant une fragmentation du réseau mitochondrial (Iqbal *et al.*, 2013; Koltai *et al.*, 2012), d'autres ont rapporté des données suggérant une augmentation de la fusion des mitochondries avec l'âge (Leduc-Gaudet *et al.*, 2015; Pham *et al.*, 2012). Notamment, une étude de notre laboratoire, chez la souris, ne montre aucune différence au sein des protéines de fusion et de fission, mais démontre cependant un ratio de Mfn2/Drp1 augmenté, suggérant ainsi un index de fusion dominant au sein du gastrocnémien blanc âgé (Leduc-Gaudet *et al.*, 2015). Une des récentes études a rapporté des données en lien avec nos résultats. En effet, O'Leary *et al.*, ont montré que le vieillissement est associé à une augmentation de l'expression de FIS-1, Mfn-2 dans le muscle âgé du rat (O'Leary *et al.*, 2013).

Il est à noter que ces résultats ne donnent aucune information sur l'activité de ces protéines. Les études publiées sur ce sujet ne permettent donc pas encore de tirer de conclusions définitives quant aux effets du vieillissement et de la RC sur la dynamique des mitochondries. Il est maintenant impératif de déterminer l'impact du vieillissement de la RC sur les niveaux de phosphorylation de ces protéines. Il est également essentiel de noter que l'utilisation d'un seul muscle squelettique ne permettra pas de statuer sur les effets du vieillissement et de la RC sur la morphologie et la dynamique des mitochondries. Nos données démontrent que toutes études visant

à étudier l'impact du vieillissement, d'intervention, de traitement et/ou de pathologies sur la dynamique et la morphologie des mitochondries dans les muscles squelettiques nécessitent l'étude de muscles oxydatifs et glycolytiques.

CHAPITRE V

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Cette étude a permis de déterminer que l'atrophie musculaire squelettique liée au vieillissement est associée à i) une fragmentation des mitochondries SS et IMF dans le muscle oxydatif SOL, (ii) un élargissement des mitochondries SS et une augmentation de la complexité et du branchement des mitochondries IMF dans le muscle glycolytique WG, (iii) une augmentation du contenu de la protéine de fission Drp1 dans le SOL et (iv) une augmentation des contenus en Drp1, Fis1 et Mfn2 dans le Gas. Nous montrons également que la RC i) abolit les effets du vieillissement sur la proportion des différents types de fibres musculaires dans les muscles SOL et Gas, (ii) atténue la fragmentation liée au vieillissement des mitochondries SS et IMF dans le SOL, (ii) n'atténue pas l'augmentation de Drp1 mais augmente le contenu en Mfn2 dans le SOL et (iv) atténue les effets du vieillissement sur la dynamique mitochondriale dans le WG. Pris dans leur ensemble, nos résultats mettent clairement en évidence le fait que les effets du vieillissement et de la CR sur la morphologie et la dynamique des mitochondries sont extrêmement complexes et varient en fonction du type de muscle (oxydatif vs glycolytique).

Il est important de prendre en considération que cette étude est la première à statuer sur les effets du vieillissement et de la restriction calorique au sein de deux types de muscles en démontrant des atteintes et des adaptations très différentes pour chacun des muscles. Des analyses supplémentaires sont maintenant nécessaires afin de déterminer les effets de la RC sur les fonctions mitochondriales, comme la fonction PTPm et l'affinité mitochondriale pour l'ADP dans les muscles squelettiques adultes et âgés mais également sur de jeunes rats en RC sur ces deux types de muscles. Il faudrait également déterminer si l'impact du vieillissement et de la RC sur la fonction mitochondriale est lié à la morphologie / dynamique mitochondriale impliquée dans la sarcopénie. Afin de tester cette dynamique, l'étude des protéines phosphorylées (P-

DRP1, P-Fis1, P-Mfn2, P-OPA1) déterminerait l'activité de celles-ci après avoir déterminé leur expression. De plus, il serait intéressant d'approfondir les connaissances sur le processus autophagique des mitochondries et la mitophagie en condition de restriction calorique. De récentes données indiquent que le vieillissement des muscles squelettiques pourrait être associé à une capacité réduite à éliminer les mitochondries endommagées par la mitophagie, causant ainsi l'accumulation de mitochondries dysfonctionnelles (Gouspillou *et al.*, 2014b). Ces nouvelles connaissances ouvriraient donc la voie à de futures études mécanistes qui auront l'intention d'imiter les effets protecteurs de la RC en utilisant des manipulations virales adéno-associées de l'expression des gènes. À long terme, cela permettra donc des améliorations majeures de notre compréhension actuelle des mécanismes causant la sarcopénie. Ce genre d'études permettra également d'accroître notre compréhension de la régulation de la biologie mitochondriale en permettant de définir les liens qui unissent fonction, morphologie et les processus de contrôle de qualité des mitochondries dans les muscles squelettiques. En fin de compte, les nouvelles connaissances pourraient trouver une application dans la prévention de la sarcopénie et d'autres événements délétères affectant les muscles squelettiques et leurs mitochondries.

RÉFÉRENCES

- Anderson EJ & Neufer PD (2006) Type II skeletal myofibers possess unique properties that potentiate mitochondrial H₂O₂ generation. *American journal of physiology. Cell physiology* 290(3):C844-851.
- Asami DK, McDonald RB, Hagopian K, Horwitz BA, Warman D, Hsiao A, Warden C & Ramsey JJ (2008) Effect of aging, caloric restriction, and uncoupling protein 3 (UCP3) on mitochondrial proton leak in mice. *Exp Gerontol* 43(12):1069-1076.
- Aspnes LE, Lee CM, Weindruch R, Chung SS, Roecker EB & Aiken JM (1997) Caloric restriction reduces fiber loss and mitochondrial abnormalities in aged rat muscle. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 11(7):573-581.
- Austin S & St-Pierre J (2012) PGC1 α and mitochondrial metabolism – emerging concepts and relevance in ageing and neurodegenerative disorders. *Journal of cell science* 125(21):4963.
- Bach D, Naon D, Pich S, Soriano FX, Vega N, Rieusset J, Laville M, Guillet C, Boirie Y, Wallberg-Henriksson H, Manco M, Calvani M, Castagneto M, Palacin M, Mingrone G, Zierath JR, Vidal H & Zorzano A (2005) Expression of Mfn2, the Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A gene, in human skeletal muscle: effects of type 2 diabetes, obesity, weight loss, and the regulatory role of tumor necrosis factor alpha and interleukin-6. *Diabetes* 54(9):2685-2693.
- Balaban RS, Nemoto S & Finkel T (2005) Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell* 120(4):483-495.
- 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. *The American journal of physiology* 273(4 Pt 1):E790-800.
- Bartz, R.R., Suliman, H.B. and Piantadosi, C.A. (2015) 'Redox mechanisms of cardiomyocyte mitochondrial protection', *Frontiers in Physiology*, 6, p. 291.
- Benard G, Bellance N, James D, Parrone P, Fernandez H, Letellier T & Rossignol R (2007a) Mitochondrial bioenergetics and structural network organization. *Journal of cell science* 120(Pt 5):838-848.

- Benard G, Bellance N, James D, Parrone P, Fernandez H, Letellier T & Rossignol R (2007b) Mitochondrial bioenergetics and structural network organization. *J Cell Sci* 120(Pt 5):838-848.
- Bruce SA, Newton D & Woledge RC (1989) Effect of age on voluntary force and cross-sectional area of human adductor pollicis muscle. *Q J Exp Physiol* 74(3):359-362.
- Butler-Browne, G and Bigard, A-X (2006). Muscle ageing and preventive effects of regular exercise. *Science Sports*, 21 :184–193.
- Castaneda C, Dolnikowski GG, Dallal GE, Evans WJ & Crim MC (1995) Protein turnover and energy metabolism of elderly women fed a low-protein diet. *The American journal of clinical nutrition* 62(1):40-48.
- Cerri AP, Bellelli G, Mazzone A, Pittella F, Landi F, Zambon A & Annoni G (2015) Sarcopenia and malnutrition in acutely ill hospitalized elderly: Prevalence and outcomes. *Clin Nutr* 34(4):745-751.
- Chabi B, Ljubcic V, Menzies KJ, Huang JH, Saleem A & Hood DA (2008) Mitochondrial function and apoptotic susceptibility in aging skeletal muscle. *Aging cell* 7(1):2-12.
- Chan DC (2006) Mitochondrial fusion and fission in mammals. *Annual review of cell and developmental biology* 22:79-99.
- Chandel, N.S., Maltepe, E., Goldwasser, E., Mathieu, C.E., Simon, M.C. and Schumacker, P.T. (1998) 'Mitochondrial reactive oxygen species trigger hypoxia-induced transcription', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(20), pp. 11715-11720
- Chen H, Chomyn A & Chan DC (2005a) Disruption of fusion results in mitochondrial heterogeneity and dysfunction. *J Biol Chem* 280(28):26185-26192.
- Chen H, Chomyn A & Chan DC (2005b) Disruption of fusion results in mitochondrial heterogeneity and dysfunction. *The Journal of biological chemistry* 280(28):26185-26192.
- Chen H, Vermulst M, Wang YE, Chomyn A, Prolla TA, McCaffery JM & Chan DC (2010) Mitochondrial fusion is required for mtDNA stability in skeletal muscle and tolerance of mtDNA mutations. *Cell* 141(2):280-289.

- Chen Q, Vazquez EJ, Moghaddas S, Hoppel CL & Lesnefsky EJ (2003) Production of reactive oxygen species by mitochondria: central role of complex III. *The Journal of biological chemistry* 278(38):36027-36031.
- Cipolat S, Martins de Brito O, Dal Zilio B & Scorrano L (2004) OPA1 requires mitofusin 1 to promote mitochondrial fusion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(45):15927-15932.
- Clark BC & Taylor JL (2011) Age-related changes in motor cortical properties and voluntary activation of skeletal muscle. *Curr Aging Sci* 4(3):192-199.
- Clarke KJ, Carroll AM, O'Brien G & Porter RK (2015) Detection of UCP1 protein and measurements of dependent GDP-sensitive proton leak in non-phosphorylating thymus mitochondria. *Methods Mol Biol* 1241:123-135.
- Coggan AR, Spina RJ, King DS, Rogers MA, Brown M, Nemeth PM & Holloszy JO (1992) Skeletal muscle adaptations to endurance training in 60- to 70-yr-old men and women. *J Appl Physiol* (1985) 72(5):1780-1786.
- Cohen HY, Miller C, Bitterman KJ, Wall NR, Hekking B, Kessler B, Howitz KT, Gorospe M, de Cabo R & Sinclair DA (2004) Calorie restriction promotes mammalian cell survival by inducing the SIRT1 deacetylase. *Science* 305(5682):390-392.
- Cohn SH, Vartsky D, Yasumura S, Sawitsky A, Zanzi I, Vaswani A & Ellis KJ (1980) Compartmental body composition based on total-body nitrogen, potassium, and calcium. *The American journal of physiology* 239(6):E524-530.
- Colman RJ, Anderson RM, Johnson SC, Kastman EK, Kosmatka KJ, Beasley TM, Allison DB, Cruzen C, Simmons HA, Kemnitz JW & Weindruch R (2009) Caloric restriction delays disease onset and mortality in rhesus monkeys. *Science* 325(5937):201-204.
- Cree MG, Newcomer BR, Katsanos CS, Sheffield-Moore M, Chinkes D, Aarsland A, Urban R & Wolfe RR (2004) Intramuscular and liver triglycerides are increased in the elderly. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 89(8):3864-3871.
- Cruz-Jentoft AJ, Baeyens JP, Bauer JM, Boirie Y, Cederholm T, Landi F, Martin FC, Michel JP, Rolland Y, Schneider SM, Topinkova E, Vandewoude M & Zamboni M (2010a) Sarcopenia: European consensus on definition and diagnosis: Report of the European Working Group on Sarcopenia in Older People. *Age and ageing* 39(4):412-423.

- Cruz-Jentoft AJ, Landi F, Topinkova E & Michel JP (2010b) Understanding sarcopenia as a geriatric syndrome. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care* 13(1):1-7.
- D'Antona G, Pellegrino MA, Adami R, Rossi R, Carlizzi CN, Canepari M, Saltin B & Bottinelli R (2003) The effect of ageing and immobilization on structure and function of human skeletal muscle fibres. *The Journal of physiology* 552(Pt 2):499-511.
- Delbono O (2011) Expression and regulation of excitation-contraction coupling proteins in aging skeletal muscle. *Curr Aging Sci* 4(3):248-259.
- Desai VG, Weindruch R, Hart RW & Feuers RJ (1996) Influences of age and dietary restriction on gastrocnemius electron transport system activities in mice. *Archives of biochemistry and biophysics* 333(1):145-151.
- Dirks A & Leeuwenburgh C (2002) Apoptosis in skeletal muscle with aging. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* 282(2):R519-527.
- Dirks AJ & Leeuwenburgh C (2004) Aging and lifelong calorie restriction result in adaptations of skeletal muscle apoptosis repressor, apoptosis-inducing factor, X-linked inhibitor of apoptosis, caspase-3, and caspase-12. *Free radical biology & medicine* 36(1):27-39.
- Dirks AJ & Leeuwenburgh C (2005) The role of apoptosis in age-related skeletal muscle atrophy. *Sports Med* 35(6):473-483.
- Drew B & Leeuwenburgh C (2003) Method for measuring ATP production in isolated mitochondria: ATP production in brain and liver mitochondria of Fischer-344 rats with age and caloric restriction. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* 285(5):R1259-1267.
- Droge, W. (2002) 'Free radicals in the physiological control of cell function', *Physiol Rev*, 82(1), pp. 47-95
- Duvall E & Wyllie AH (1986) Death and the cell. *Immunology today* 7(4):115-119.
- Edstrom E, Altun M, Bergman E, Johnson H, Kullberg S, Ramirez-Leon V & Ulfhake B (2007) Factors contributing to neuromuscular impairment and sarcopenia during aging. *Physiol Behav* 92(1-2):129-135.

- Elston, T., Wang, H. and Oster, G. (1998) 'Energy transduction in ATP synthase', *Nature*, 391(6666), pp. 510-3.
- Ernster L & Schatz G (1981) Mitochondria: a historical review. *The Journal of cell biology* 91(3 Pt 2):227s-255s.
- Fayet G, Rouche A, Hogrel JY, Tome FM & Fardeau M (2001) Age-related morphological changes of the deltoid muscle from 50 to 79 years of age. *Acta Neuropathol* 101(4):358-366.
- Ferguson, S.J. (2010) 'ATP synthase: From sequence to ring size to the P/O ratio', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(39), pp. 16755-16756.
- Ferrucci L, Corsi A, Lauretani F, Bandinelli S, Bartali B, Taub DD, Guralnik JM & Longo DL (2005) The origins of age-related proinflammatory state. *Blood* 105(6):2294-2299.
- Fielding RA, Vellas B, Evans WJ, Bhasin S, Morley JE, Newman AB, Abellan van Kan G, Andrieu S, Bauer J, Breuille D, Cederholm T, Chandler J, De Meynard C, Donini L, Harris T, Kannt A, Keime Guibert F, Onder G, Papanicolaou D, Rolland Y, Rooks D, Sieber C, Souhami E, Verlaan S & Zamboni M (2011) Sarcopenia: an undiagnosed condition in older adults. Current consensus definition: prevalence, etiology, and consequences. International working group on sarcopenia. *Journal of the American Medical Directors Association* 12(4):249-256.
- Finkel, T. (1998) 'Oxygen radicals and signaling', *Curr Opin Cell Biol*, 10(2), pp. 248-53.
- Fontana L, Klein S & Holloszy JO (2010) Effects of long-term calorie restriction and endurance exercise on glucose tolerance, insulin action, and adipokine production. *Age (Dordr)* 32(1):97-108.
- Franceschi C & Campisi J (2014) Chronic inflammation (inflammaging) and its potential contribution to age-associated diseases. *The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences* 69 Suppl 1:S4-9.
- Frontera WR, Suh D, Krivickas LS, Hughes VA, Goldstein R & Roubenoff R (2000) Skeletal muscle fiber quality in older men and women. *American journal of physiology. Cell physiology* 279(3):C611-618.

- Fujimaki S & Kuwabara T (2017) Diabetes-Induced Dysfunction of Mitochondria and Stem Cells in Skeletal Muscle and the Nervous System. *Int J Mol Sci* 18(10).
- Giustina A, Barkan A, Chanson P, Grossman A, Hoffman A, Ghigo E, Casanueva F, Colao A, Lamberts S, Sheppard M & Melmed S (2008) Guidelines for the treatment of growth hormone excess and growth hormone deficiency in adults. *Journal of endocrinological investigation* 31(9):820-838.
- Gomes LC, Di Benedetto G & Scorrano L (2011a) During autophagy mitochondria elongate, are spared from degradation and sustain cell viability. *Nat Cell Biol* 13(5):589-598.
- Gomes LC, Di Benedetto G & Scorrano L (2011b) During autophagy mitochondria elongate, are spared from degradation and sustain cell viability. *Nat Cell Biol* 13(5):589-598.
- Gospillou G, Bourdel-Marchasson I, Rouland R, Calmettes G, Biran M, Deschodt-Arsac V, Miraux S, Thiaudiere E, Pasdois P, Detaille D, Franconi JM, Babot M, Trezeguet V, Arsac L & Diolez P (2014a) Mitochondrial energetics is impaired in vivo in aged skeletal muscle. *Aging cell* 13(1):39-48.
- Gospillou G, Bourdel-Marchasson I, Rouland R, Calmettes G, Franconi JM, Deschodt-Arsac V & Diolez P (2010) Alteration of mitochondrial oxidative phosphorylation in aged skeletal muscle involves modification of adenine nucleotide translocator. *Biochimica et biophysica acta* 1797(2):143-151.
- Gospillou G & Hepple RT (2013) Facts and controversies in our understanding of how caloric restriction impacts the mitochondrion. *Experimental gerontology* 48(10):1075-1084.
- Gospillou G, Sgarioto N, Kapchinsky S, Purves-Smith F, Norris B, Pion CH, Barbat-Artigas S, Lemieux F, Taivassalo T, Morais JA, Aubertin-Leheudre M & Hepple RT (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.
- Gospillou G, Sgarioto N, Norris B, Barbat-Artigas S, Aubertin-Leheudre M, Morais JA, Burelle Y, Taivassalo T & Hepple RT (2014c) The relationship between muscle fiber type-specific PGC-1 α content and mitochondrial content varies between rodent models and humans. *PloS one* 9(8):e103044.
- Gredilla R, Sanz A, Lopez-Torres M & Barja G (2001) Caloric restriction decreases mitochondrial free radical generation at complex I and lowers oxidative damage

to mitochondrial DNA in the rat heart. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 15(9):1589-1591.

Harman D (1956) Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *Journal of gerontology* 11(3):298-300.

Harman D (1972) The biologic clock: the mitochondria? *Journal of the American Geriatrics Society* 20(4):145-147.

Hepple RT, Baker DJ, Kaczor JJ & Krause DJ (2005) Long-term caloric restriction abrogates the age-related decline in skeletal muscle aerobic function. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 19(10):1320-1322.

Hepple RT, Baker DJ, McConkey M, Muryinka T & Norris R (2006) Caloric restriction protects mitochondrial function with aging in skeletal and cardiac muscles. *Rejuvenation research* 9(2):219-222.

Horbay R & Bilyy R (2016) Mitochondrial dynamics during cell cycling. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death* 21(12):1327-1335.

Huang JH, Joseph AM, Ljubicic V, Iqbal S & Hood DA (2010) Effect of age on the processing and import of matrix-destined mitochondrial proteins in skeletal muscle. *The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences* 65(2):138-146.

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.

Irving BA, Robinson MM & Nair KS (2012) Age effect on myocellular remodeling: response to exercise and nutrition in humans. *Ageing research reviews* 11(3):374-389.

Jahani-Asl A, Cheung EC, Neuspiel M, MacLaurin JG, Fortin A, Park DS, McBride HM & Slack RS (2007) Mitofusin 2 protects cerebellar granule neurons against injury-induced cell death. *J Biol Chem* 282(33):23788-23798.

Jakobs S (2006) High resolution imaging of live mitochondria. *Biochimica et biophysica acta* 1763(5-6):561-575.

Jakobsson F, Borg K & Edstrom L (1990) Fibre-type composition, structure and cytoskeletal protein location of fibres in anterior tibial muscle. Comparison

between young adults and physically active aged humans. *Acta Neuropathol* 80(5):459-468.

- 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, Heymsfield SB, Wang ZM & Ross R (2000) Skeletal muscle mass and distribution in 468 men and women aged 18-88 yr. *J Appl Physiol* (1985) 89(1):81-88.
- Jensen GL (2008) Inflammation: roles in aging and sarcopenia. *JPEN. Journal of parenteral and enteral nutrition* 32(6):656-659.
- Jubrias SA, Odderson IR, Esselman PC & Conley KE (1997) Decline in isokinetic force with age: muscle cross-sectional area and specific force. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 434(3):246-253.
- 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):239-257.
- Kolovou G, Katsiki N, Pavlidis A, Bilianou H, Goumas G & Mikhailidis DP (2014) Ageing mechanisms and associated lipid changes. *Current vascular pharmacology* 12(5):682-689.
- 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):R127-134.
- Kostek MC & Delmonico MJ (2011) Age-related changes in adult muscle morphology. *Curr Aging Sci* 4(3):221-233.
- Koves TR, Noland RC, Bates AL, Henes ST, Muoio DM & Cortright RN (2005) Subsarcolemmal and intermyofibrillar mitochondria play distinct roles in regulating skeletal muscle fatty acid metabolism. *American journal of physiology. Cell physiology* 288(5):C1074-1082.
- Lanza IR, Zabielski P, Klaus KA, Morse DM, Heppelmann CJ, Bergen HR, 3rd, Dasari S, Walrand S, Short KR, Johnson ML, Robinson MM, Schimke JM, Jakaitis DR, Asmann YW, Sun Z & Nair KS (2012) Chronic caloric restriction preserves mitochondrial function in senescence without increasing mitochondrial biogenesis. *Cell metabolism* 16(6):777-788.

- Laviola L, Natalicchio A & Giorgino F (2007) The IGF-I signaling pathway. *Current pharmaceutical design* 13(7):663-669.
- Leduc-Gaudet JP, Picard M, St-Jean Pelletier F, Sgarioto N, Auger MJ, Vallee 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.
- Lee HC & Wei YH (2001) Mitochondrial alterations, cellular response to oxidative stress and defective degradation of proteins in aging. *Biogerontology* 2(4):231-244.
- Lee HJ, Lee HJ, Lee EO, Ko SG, Bae HS, Kim CH, Ahn KS, Lu J & Kim SH (2008) Mitochondria-cytochrome C-caspase-9 cascade mediates isorhamnetin-induced apoptosis. *Cancer letters* 270(2):342-353.
- Lee HY, Choi CS, Birkenfeld AL, Alves TC, Jornayvaz FR, Jurczak MJ, Zhang D, Woo DK, Shadel GS, Ladiges W, Rabinovitch PS, Santos JH, Petersen KF, Samuel VT & Shulman GI (2010) Targeted expression of catalase to mitochondria prevents age-associated reductions in mitochondrial function and insulin resistance. *Cell metabolism* 12(6):668-674.
- 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):R1288-1296.
- Lexell J (1995) Human aging, muscle mass, and fiber type composition. *The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences* 50 Spec No:11-16.
- Lexell J, Taylor CC & Sjostrom 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(2-3):275-294.
- Lin MT & Beal MF (2006) Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature* 443(7113):787-795.
- Lindle RS, Metter EJ, Lynch NA, Fleg JL, Fozard JL, Tobin J, Roy TA & Hurley BF (1997) Age and gender comparisons of muscle strength in 654 women and men aged 20-93 yr. *J Appl Physiol* (1985) 83(5):1581-1587.

- Loschen, G., Azzi, A., Richter, C. and Flohé, L. (1974) 'Superoxide radicals as precursors of mitochondrial hydrogen peroxide', *FEBS Letters*, 42(1), pp. 68-72.
- Maalouf M, Rho JM & Mattson MP (2009) The neuroprotective properties of calorie restriction, the ketogenic diet, and ketone bodies. *Brain research reviews* 59(2):293-315.
- Mansouri A, Muller FL, Liu Y, Ng R, Faulkner J, Hamilton M, Richardson A, Huang TT, 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.
- Margulis L (1975) Symbiotic theory of the origin of eukaryotic organelles; criteria for proof. *Symposia of the Society for Experimental Biology* (29):21-38.
- Marzetti E, Calvani R, Cesari M, Buford TW, Lorenzi M, Behnke BJ & Leeuwenburgh C (2013) Mitochondrial dysfunction and sarcopenia of aging: from signaling pathways to clinical trials. *The international journal of biochemistry & cell biology* 45(10):2288-2301.
- Marzetti E & Leeuwenburgh C (2006) Skeletal muscle apoptosis, sarcopenia and frailty at old age. *Experimental gerontology* 41(12):1234-1238.
- Marzetti E, Wohlgemuth SE, Lees HA, Chung HY, Giovannini S & Leeuwenburgh C (2008) Age-related activation of mitochondrial caspase-independent apoptotic signaling in rat gastrocnemius muscle. *Mechanisms of ageing and development* 129(9):542-549.
- Masoro EJ, Yu BP & Bertrand HA (1982) Action of food restriction in delaying the aging process. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 79(13):4239-4241.
- Mattison JA, Colman RJ, Beasley TM, Allison DB, Kemnitz JW, Roth GS, Ingram DK, Weindruch R, de Cabo R & Anderson RM (2017) Caloric restriction improves health and survival of rhesus monkeys. *Nature communications* 8:14063.
- Mattison JA, Roth GS, Beasley TM, Tilmont EM, Handy AM, Herbert RL, Longo DL, Allison DB, Young JE, Bryant M, Barnard D, Ward WF, Qi W, Ingram DK & de Cabo R (2012) Impact of caloric restriction on health and survival in rhesus monkeys from the NIA study. *Nature* 489(7415):318-321.

- McCay CM (1935) Iodized Salt a Hundred Years Ago. *Science* 82(2128):350-351.
- McKiernan SH, Bua E, McGorray J & Aiken J (2004) Early-onset calorie restriction conserves fiber number in aging rat skeletal muscle. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 18(3):580-581.
- Mercken EM, Crosby SD, Lamming DW, JeBailey L, Krzysik-Walker S, Villareal DT, Capri M, Franceschi C, Zhang Y, Becker K, Sabatini DM, de Cabo R & Fontana L (2013) Calorie restriction in humans inhibits the PI3K/AKT pathway and induces a younger transcription profile. *Aging cell* 12(4):645-651.
- Morley JE, Baumgartner RN, Roubenoff R, Mayer J & Nair KS (2001) Sarcopenia. *J Lab Clin Med* 137(4):231-243.
- Morley JE, Haren MT, Rolland Y & Kim MJ (2006) Frailty. *The Medical clinics of North America* 90(5):837-847.
- Murphy MP (2009) How mitochondria produce reactive oxygen species. *The Biochemical journal* 417(1):1-13.
- Nicholls D. G., Ferguson S. (2013). Bioenergetics. Cambridge, MA: *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):C422-430.
- Ogata T & Yamasaki Y (1987) High-resolution scanning electron-microscopic studies on the three-dimensional structure of mitochondria and sarcoplasmic reticulum in the different twitch muscle fibers of the frog. *Cell and tissue research* 250(3):489-497.
- Ogata T & Yamasaki Y (1997) Ultra-high-resolution scanning electron microscopy of mitochondria and sarcoplasmic reticulum arrangement in human red, white, and intermediate muscle fibers. *Anat Rec* 248(2):214-223.
- Omodei D & Fontana L (2011) Calorie restriction and prevention of age-associated chronic disease. *FEBS letters* 585(11):1537-1542.
- Ong SB, Subrayan S, Lim SY, Yellon DM, Davidson SM & Hausenloy DJ (2010) Inhibiting mitochondrial fission protects the heart against ischemia/reperfusion injury. *Circulation* 121(18):2012-2022.

- Payne AM, Dodd SL & Leeuwenburgh C (2003) Life-long calorie restriction in Fischer 344 rats attenuates age-related loss in skeletal muscle-specific force and reduces extracellular space. *J Appl Physiol* (1985) 95(6):2554-2562.
- Perrini S, Laviola L, Carreira MC, Cignarelli A, Natalicchio A & Giorgino F (2010) The GH/IGF1 axis and signaling pathways in the muscle and bone: mechanisms underlying age-related skeletal muscle wasting and osteoporosis. *The Journal of endocrinology* 205(3):201-210.
- Pham AH, McCaffery JM & Chan DC (2012) Mouse lines with photo-activatable mitochondria to study mitochondrial dynamics. *Genesis* 50(11):833-843.
- Phillips T & Leeuwenburgh C (2005) Muscle fiber specific apoptosis and TNF-alpha signaling in sarcopenia are attenuated by life-long calorie restriction. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 19(6):668-670.
- Picard M, Csukly K, Robillard ME, Godin R, Ascah A, Bourcier-Lucas C & Burelle Y (2008) Resistance to Ca²⁺-induced opening of the permeability transition pore differs in mitochondria from glycolytic and oxidative muscles. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* 295(2):R659-668.
- Picard M, Gentil BJ, McManus MJ, White K, St Louis K, Gartside SE, Wallace DC & Turnbull DM (2013a) Acute exercise remodels mitochondrial membrane interactions in mouse skeletal muscle. *J Appl Physiol* (1985) 115(10):1562-1571.
- Picard M, Hepple RT & Burelle Y (2012) Mitochondrial functional specialization in glycolytic and oxidative muscle fibers: tailoring the organelle for optimal function. *American journal of physiology. Cell physiology* 302(4):C629-641.
- 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.
- Picard M, Shirihaï OS, Gentil BJ & Burelle Y (2013b) Mitochondrial morphology transitions and functions: implications for retrograde signaling? *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* 304(6):R393-406.
- Picard M, Taivassalo T, Gouspillou G & Hepple RT (2011a) Mitochondria: isolation, structure and function. *The Journal of physiology* 589(Pt 18):4413-4421.

- Picard M, Taivassalo T, Ritchie D, Wright KJ, Thomas MM, Romestaing C & Hepple RT (2011b) Mitochondrial structure and function are disrupted by standard isolation methods. *PLoS one* 6(3):e18317.
- Picard M, White K & Turnbull DM (2013c) Mitochondrial morphology, topology, and membrane interactions in skeletal muscle: a quantitative three-dimensional electron microscopy study. *J Appl Physiol* (1985) 114(2):161-171.
- Pierce, G.B., Parchment, R.E. and Lewellyn, A.L. (1991) 'Hydrogen peroxide as a mediator of programmed cell death in the blastocyst', *Differentiation*, 46(3), pp. 181-186.
- Porter.C, Hurren.N, Cotter.M, Bhattarai.N, Reidy.P, Dillon.E, Durham.W, Tuvdendorj.D, Sheffield-Moore.M, Volpi.E, Sidossis.L, Rasmussen.B & Børsheim.L.E (2015) Mitochondrial respiratory capacity and coupling control decline with age in human skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab*
- Purves-Smith FM, Sgarbiato N & Hepple RT (2014) Fiber typing in aging muscle. *Exercise and sport sciences reviews* 42(2):45-52.
- Ranhotra HS (2010) Long-term caloric restriction up-regulates PPAR gamma co-activator 1 alpha (PGC-1alpha) expression in mice. *Indian journal of biochemistry & biophysics* 47(5):272-277.
- Rhee, S.G., Bae, Y.S., Lee, S.R. and Kwon, J. (2000) 'Hydrogen peroxide: a key messenger that modulates protein phosphorylation through cysteine oxidation', *Sci STKE*, 2000(53), p. pe1.
- Romanello V & Sandri M (2013) Mitochondrial biogenesis and fragmentation as regulators of protein degradation in striated muscles. *Journal of molecular and cellular cardiology* 55:64-72.
- Romanello V & Sandri M (2015) Mitochondrial Quality Control and Muscle Mass Maintenance. *Frontiers in physiology* 6:422.
- Rosenberg IH (1997) Sarcopenia: origins and clinical relevance. *The Journal of nutrition* 127(5 Suppl):990S-991S.
- Roth GS, Lane MA & Ingram DK (2005) Caloric restriction mimetics: the next phase. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1057:365-371.
- Sakellariou GK, Pearson T, Lightfoot AP, Nye GA, Wells N, Giakoumaki, II, Griffiths RD, McArdle A & Jackson MJ (2016a) 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. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 30(11):3771-3785.

- Sakellariou GK, Pearson T, Lightfoot AP, Nye GA, Wells N, Giakoumaki, II, Vasilaki A, Griffiths RD, Jackson MJ & McArdle A (2016b) Mitochondrial ROS regulate oxidative damage and mitophagy but not age-related muscle fiber atrophy. *Sci Rep* 6:33944.
- Santel A & Fuller MT (2001) Control of mitochondrial morphology by a human mitofusin. *Journal of cell science* 114(Pt 5):867-874.
- Schaap LA, Pluijm SM, Deeg DJ & Visser M (2006) Inflammatory markers and loss of muscle mass (sarcopenia) and strength. *The American journal of medicine* 119(6):526 e529-517.
- Scherz-Shouval, R., Shvets, E., Fass, E., Shorer, H., Gil, L. and Elazar, Z. (2007) 'Reactive oxygen species are essential for autophagy and specifically regulate the activity of Atg4', *EMBO Journal*, 26(7), pp. 1749-1760.
- Schmitz ML, Bacher S & Droge W (2002) Molecular analysis of mitogen-activated protein kinase signaling pathways induced by reactive oxygen intermediates. *Methods in enzymology* 352:53-61.
- Sena, Laura A. and Chandel, Navdeep S. (2012) 'Physiological Roles of Mitochondrial Reactive Oxygen Species', *Molecular Cell*, 48(2), pp. 158-167.
- Seo AY, Joseph AM, Dutta D, Hwang JC, Aris JP & Leeuwenburgh C (2010) New insights into the role of mitochondria in aging: mitochondrial dynamics and more. *Journal of cell science* 123(Pt 15):2533-2542.
- Shaw JM & Nunnari J (2002) Mitochondrial dynamics and division in budding yeast. *Trends in cell biology* 12(4):178-184.
- Shen L, Du J, Xia Y, Tan Z, Fu Y, Yang Q, Li X, Tang G, Jiang Y, Wang J, Li M, Zhang S & Zhu L (2016) Genome-wide landscape of DNA methylomes and their relationship with mRNA and miRNA transcriptomes in oxidative and glycolytic skeletal muscles. *Sci Rep* 6:32186.
- Sherer TB, Betarbet R & Greenamyre JT (2002) Environment, mitochondria, and Parkinson's disease. *The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry* 8(3):192-197.

- 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.
- Smirnova E, Griparic L, Shurland DL & van der Bliek AM (2001) Dynamin-related protein Drp1 is required for mitochondrial division in mammalian cells. *Molecular biology of the cell* 12(8):2245-2256.
- Sohal RS & Dubey A (1994) Mitochondrial oxidative damage, hydrogen peroxide release, and aging. *Free radical biology & medicine* 16(5):621-626.
- St-Jean-Pelletier F, Pion CH, Leduc-Gaudet JP, Sgarioto N, Zovile I, Barbat-Artigas S, Reynaud O, Alkaterji F, Lemieux FC, Grenon A, Gaudreau P, Hepple RT, Chevalier S, Belanger M, Morais JA, Aubertin-Leheudre M & Gouspillou G (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* 10.1002/jcsm.12139.
- Stadtman ER (2004) Role of oxidant species in aging. *Current medicinal chemistry* 11(9):1105-1112.
- Suzuki M, Jeong SY, Karbowski M, Youle RJ & Tjandra N (2003) The solution structure of human mitochondria fission protein Fis1 reveals a novel TPR-like helix bundle. *Journal of molecular biology* 334(3):445-458.
- Suzuki M, Shibamura M & Kimura S (2010) Effect of severe maternal dietary restriction on growth and intra-abdominal adipose tissue weights in offspring rats. *Journal of nutritional science and vitaminology* 56(5):293-298.
- Terman A and Brunk UT. The aging myocardium: roles of mitochondrial damage and lysosomal degradation. *Heart, lung & circulation*. 2005; 14:107-114
- Terman A, Kurz T, Navratil M, Arriaga EA & Brunk UT (2010) Mitochondrial turnover and aging of long-lived postmitotic cells: the mitochondrial-lysosomal axis theory of aging. *Antioxidants & redox signaling* 12(4):503-535.
- Tonkonogi M, Fernstrom 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. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 446(2):261-269.
- Tortora GJ, Grabowski SR. Principes d'anatomie et de physiologie (1994) Bruxelles; Anjou, Québec: De Boeck Université ; Centre Educatif et Culturel; 1203p

- Valdez G, Tapia JC, Kang H, Clemenson GD, Jr., Gage FH, Lichtman JW & Sanes JR (2010) Attenuation of age-related changes in mouse neuromuscular synapses by caloric restriction and exercise. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107(33):14863-14868.
- Vandervoort AA (2002) Aging of the human neuromuscular system. *Muscle & nerve* 25(1):17-25.
- Verdijk LB, Koopman R, Schaart G, Meijer K, Savelberg HH & van Loon LJ (2007) Satellite cell content is specifically reduced in type II skeletal muscle fibers in the elderly. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 292(1):E151-157.
- Vigneron P, Bacou F & Ashmore CR (1976) Distribution heterogeneity of muscle fiber types in the rabbit longissimus muscle. *Journal of animal science* 43(5):985-988.
- Visser M (2011) Obesity, sarcopenia and their functional consequences in old age. *The Proceedings of the Nutrition Society* 70(1):114-118.
- Walford RL, Harris SB & Weindruch R (1987) Dietary restriction and aging: historical phases, mechanisms and current directions. *The Journal of nutrition* 117(10):1650-1654.
- Wang Y & Pessin JE (2013) Mechanisms for fiber-type specificity of skeletal muscle atrophy. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care* 16(3):243-250.
- Watt, I.N., Montgomery, M.G., Runswick, M.J., Leslie, A.G.W. and Walker, J.E. (2010) 'Bioenergetic cost of making an adenosine triphosphate molecule in animal mitochondria', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(39), pp. 16823-16827.
- Weindruch R & Walford RL (1982) Dietary restriction in mice beginning at 1 year of age: effect on life-span and spontaneous cancer incidence. *Science* 215(4538):1415-1418.
- Weindruch R, Walford RL, Fligiel S & Guthrie D (1986) The retardation of aging in mice by dietary restriction: longevity, cancer, immunity and lifetime energy intake. *The Journal of nutrition* 116(4):641-654.
- 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. *Exp Gerontol* 45(2):138-148.

- Yarasheski KE, Welle S & Nair KS (2002) Muscle protein synthesis in younger and older men. *Jama* 287(3):317-318.
- Yu T, Sheu SS, Robotham JL & Yoon Y (2008) Mitochondrial fission mediates high glucose-induced cell death through elevated production of reactive oxygen species. *Cardiovasc Res* 79(2):341-351.
- Zangarelli A, Chanseume E, Morio B, Brugere C, Mosoni L, Rousset P, Giraudet C, Patrac V, Gachon P, Boirie Y & Walrand S (2006) Synergistic effects of caloric restriction with maintained protein intake on skeletal muscle performance in 21-month-old rats: a mitochondria-mediated pathway. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 20(14):2439-2450.
- Zheng J, Mutcherson R, 2nd & Helfand SL (2005) Calorie restriction delays lipid oxidative damage in *Drosophila melanogaster*. *Aging cell* 4(4):209-216.