



HAL
open science

Hypoactivité, impesanteur et déconditionnement musculaire : étude des effets précoces chez l'homme dans un modèle d'immersion sèche

Rémi Demangel

► **To cite this version:**

Rémi Demangel. Hypoactivité, impesanteur et déconditionnement musculaire : étude des effets précoces chez l'homme dans un modèle d'immersion sèche. Médecine humaine et pathologie. Université Montpellier, 2017. Français. NNT : 2017MONT4008 . tel-02788673

HAL Id: tel-02788673

<https://hal.inrae.fr/tel-02788673>

Submitted on 5 Jun 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

En Physiologie de l'Exercice (PE)

École doctorale Sciences du Mouvement Humain (SMH)

Unité de recherche UMR INRA 866 - Dynamique Musculaire et Métabolisme

Hypoactivité, impesanteur et déconditionnement musculaire : étude des effets précoces chez l'homme dans un modèle d'immersion sèche

Présentée par Rémi DEMANGEL

Le 24 Novembre 2017

Sous la co-direction de Angèle CHOPARD et Guillaume PY

Devant le jury composé de

Madame Laurence STEVENS, Professeur des Universités, Université de Lille 1

Monsieur Philippe NOIREZ, Maître de Conférences - HDR, Université Paris 5 René Descartes

Monsieur Jérôme LAURIN, Maître de Conférences, Université d'Aix-Marseille

Monsieur Vincent PIALOUX, Professeur des Universités, Université de Lyon 1

Madame Angèle CHOPARD, Professeur des Universités, Université de Montpellier

Monsieur Guillaume PY, Maître de Conférences - HDR, Université de Montpellier

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examineur - Président du jury

Directeur

Co-directeur



UNIVERSITÉ
DE MONTPELLIER

*A mes parents,
Nadine & Francis,*

*A mes grands-parents,
Cécile, Lucie, Jean-Marie & Marc,*

Ludovic, Clément, Dimitri & Tom,

Margaux, Aurore, Kévin & Rémi,

Steven,

Baptiste,

REMERCIEMENTS

Ces travaux de thèse ont été entrepris au sein de l'UMR INRA 866 Dynamique Musculaire et Métabolisme à Montpellier. Ils ont été co-financés par l'Université de Montpellier et par le Centre National d'Études Spatiales que je tiens particulièrement à remercier pour leur confiance et leur soutien financier.

Dans un premier temps, je tiens tout particulièrement à remercier l'ensemble des membres de mon jury de thèse d'avoir accepté d'expertiser mon travail. Plus précisément, je voudrais remercier Madame Laurence Stevens et Monsieur Philippe Noirez d'évaluer mon travail en tant que rapporteurs. De la même manière, je souhaite remercier Monsieur Jérôme Laurin et Monsieur Vincent Pialoux pour l'évaluation mon travail en tant qu'examinateur.

Ensuite, un grand merci à toute l'unité DMEM, qui pendant 5 années m'aura permis d'apprendre, de partager énormément. Impossible de citer tout le monde, quoique... mais merci à Anne-Barbara, Vincent-Béatrice, Henri-Florence, Béatrice, François, Robin, Chantal, Évelyne, Marie-France, Ébru et Thomas, pour tous ce que vous avez pu faire pour moi, et surtout avec bienveillance, didactique et pédagogie.

Une attention toute particulière à l'équipe du midi où pendant tous ces mois, il faut que je l'avoue, j'étais (très) bien entouré et où j'aurai bien rigolé ; et sûrement un peu privilégié aussi. La mousse au chocolat avec un bout de gâteau au citron restera un des meilleurs souvenirs... gustatif !!!

Petite pensée spéciale à Fabienne. Je me souviens de ce coup de téléphone chez « Paul » le vendredi de rendu de mémoire en M2, sautant de joie pour l'attribution de la thèse, jusqu'au super voyage en Urgences qui restera « magique » en n'excluant pas notre chasse sans réussite au Jeko. Bref, ce ne sont que trois anecdotes parmi tant d'autres, mais jamais je n'oublierai tous ces moments. Merci à toi, vraiment !

Une petite pensée à la plus universitaire du plateau MRI ; merci Élodie de m'avoir transmis ton savoir en microscopie, et tes connaissances qui m'ont permis d'adorer l'immunohistologie.

De façon beaucoup plus exclusive, un grand merci au bureau 17, mon deuxième bureau il faut le dire ; François, Émilie ; sans oublier Lucas & Alexi ; ET ma Lolo ; Valentin & Ancelin... Que de moments passés, que de lames coupées et immunomarquées. Tout écrire est impossible. En revanche, me remémorer tous ces moments reste et restera un véritable plaisir. Crois moi, tous ces moments resteront à jamais, pour toujours, dans ma petite tête !

Parce que la vie est faite de rencontres exceptionnelles : Benjamin, Eugé, Marie, Jo, Yoan, Nina, Gus, Valé, Thomas, Élise. Je voulais remercier particulièrement cette équipe de Hand qui au final s'est avérée devenir la ; (ma) ; petite famille de Montpellier. Ces arrières, pivots et ailiers qui sont devenus aujourd'hui des amis, des globetrotters, des Niçois.... Des moments passés au Comptoir, en Ardèche. Merci à vous toutes et tous de m'avoir supporter.

Le Hand, cette deuxième vie ; c'est énormément de sacrifices et compromis. Un énorme merci et un agréable séjour au plus Lattois des Canadiens et au plus génial des binômes, Loïc. Entre la Corse, Ajaccio ou Corte ; l'AccorHotel Arena ; les Falcony ; et le France/Russie... j'en oublierai presque de sortir le carton Jaune !! Pourvu que ça continue, encore et encore... Ce sport, c'est aussi des rencontres, une pensée particulière à Clément, Antoine, Chloé, et Dorian. Et sans oublier Hervé et Stéphanie ! Mais ce sont aussi des coups de cœurs, des rencontres, des amitiés qui se créent et des liens qui se font. Une pensée spéciale et un grand merci à mon parisien préféré, Chef-Antoine. Un grand merci et une énorme pensée également à mon Montalbanais préféré, Damien. Enfin, une petite pensée spéciale pour Corentin.

Enfin, un énorme merci à mes bisontins préférés; Caroline, Mélanie, Alexis, Pierre et Titouan ; pour ces nombreux moments passés ensemble, et cette incroyable amitié malgré ces kilomètres.

Mais le Hand, c'est aussi trouver une résidence secondaire à seulement 800 mètres de chez soi. C'est trouver et découvrir un ami loyal, généreux, respectueux et adorable ; qui plus est lorsque sa « colocataire » est juste géniale et exceptionnelle. Dylan, Coline ; je ne pourrai jamais assez vous remercier de ces dernières semaines, ces derniers jours ou vous m'avez vu devenir de plus en plus chiant et insupportable !

A Baptiste, un mec génial et exceptionnel. Un énorme merci pour tout ce que tu as pu m'apprendre et ce que l'on a pu partager depuis toutes ces années.

Enfin, malgré la distance, malgré des emplois du temps incompatibles, avec cet objectif commun d'obtenir le grade de Docteur ; comment oublier mon meilleur ami, Steven. De cette rencontre Toulousaine à cette escapade géniale en Russie ; tu sais tout ce que je pense de toi. De cette simplicité qui te caractérise, à notre confiance et amitié partagées ; on a suffisamment échangé afin d'éviter que je m'étaie. Néanmoins, ne l'oublie pas !

Avant de terminer, je voudrais vous remercier tous les deux. Vous, mes directeurs de thèses. Angèle et Guillaume. Deux personnes aussi fantastiques, qu'exceptionnelles. Aussi géniales que respectueuses. À mon sens, un duo magique et indissociable, si ce n'est formidable. Il n'y a pas de meilleur apprentissage et meilleure formation que d'être à vos côtés. Vous m'avez tellement appris et même si tout ne fut pas simple ; vous avez ce goût de la Science, ce plaisir de partager, cette passion à transmettre que tous ces jours passés avec vous sont d'incroyables souvenirs et de magnifiques leçons apprises. Je vous serai à jamais reconnaissant de toute cette confiance que vous avez pu avoir en moi durant ces 5 dernières années. C'est inéluctablement grâce à tout ce que vous pouvez transmettre, que cette opportunité restera une expérience à jamais ancrée. Merci pour tout ce que vous avez pu faire pour moi les chefs... Sincèrement !!

Enfin, merci aux plus géniaux des parents ; les miens. Merci de me laisser faire ce que je veux, aussi loin, et depuis tout ce temps. Merci de me soutenir en permanence, même si c'est sûrement moins évident pour vous que ça ne l'est pour moi ! Merci de m'avoir appris à être ce que je suis et qui je suis : Votre grand !

Table des matières



<i>Liste des abréviations</i>	I
<i>Liste des figures</i>	IV
<i>Liste des tableaux</i>	X
<i>Avant-propos</i>	XII

CHAPITRE 1 : REVUE DE LA LITTERATURE 1

<i>Préambule</i>	2
------------------------	---

***Partie 1 : Modèles expérimentaux d'étude du déconditionnement musculaire en impesanteur réelle ou simulée*..... 4**

1. Expérimentations en situation d'impesanteur réelle.....	5
2. Expérimentations en impesanteur simulée.....	6
2.1. Modèle d'alitement prolongé avec déclivité.....	7
2.2. Modèle d'immersion sèche.....	12
2.3. Modèle de suspension unilatéral du membre inférieur.....	16
3. Modèles animaux d'étude des effets de l'hypoactivité.....	17
4. Modèles cellulaires d'étude du déconditionnement musculaire.....	19

***Partie 2 : Le déconditionnement musculaire*..... 20**

1. Le déconditionnement musculaire : une perte de masse et de force musculaire.....	22
1.1. Paramètres de force, raideur, couple force-vitesse.....	25
1.2. Evaluation des sections transversales des groupes musculaires, des muscles, et des fibres musculaires.....	26
1.3. Hypoactivité et changements myotypologiques.....	30
2. Le déconditionnement musculaire et l'accumulations d'infiltrations graisseuses.....	33
2.1. Définition et localisation des infiltrations graisseuses ou IMAT et leurs localisations.....	33
2.2. IMAT et fonction musculaire.....	34
2.3. IMAT et déconditionnement musculaire.....	35
3. Altération de la jonction neuromusculaire lors du déconditionnement musculaire.....	37
4. Déconditionnement musculaire et balance protéique.....	39
4.1. Déconditionnement et activation des systèmes protéolytiques.....	40
4.2. Le système des calpaïnes.....	40
4.3. Le système ubiquitine protéasome.....	41
4.4. Le système autophagique-lysosomal.....	43
4.5. Le système de l'apoptose.....	44
4.6. Déconditionnement et altération de la synthèse protéique.....	45

***Partie 3 : Objectifs de la thèse*..... 48**

CHAPITRE 2 : ÉTUDE DU DECONDITIONNEMENT MUSCULAIRE SUITE A 3 JOURS D'IMMERSION SECHE 50

<i>Préambule</i>	51
------------------------	----

1. Présentation du protocole général.....	54
2. Les conditions de participation : de l'éthique aux critères nécessaires de l'étude.....	55
2.1. Numéro d'éthique.....	55
2.2. Informations des participants et formulaire de consentement.....	55
2.3. Recrutement et critères d'inclusion/exclusion	55
2.3.1. <i>Les critères d'inclusion de l'étude</i>	56
2.3.2. <i>Les critères d'exclusion de l'étude</i>	57
3. Présentation des données anthropométriques des sujets de l'étude.....	57
4. Présentation du chronogramme détaillé de l'expérimentation et des différents tests effectués lors du séjour dans la clinique spatiale.....	58
5. Apports contrôlés de la nutrition durant le protocole expérimental	60
6. Méthodologie expérimentale de l'étude.....	61
6.1. Biopsies musculaires.....	61
6.2. Analyse immunohistochimique des biopsies musculaires	61
6.2.1. <i>Marquage par immunofluorescence</i>	61
6.2.2. <i>Évaluation du degré d'atrophie des fibres musculaires et des changements myotypologiques</i>	63
6.2.3. <i>Identification spécifique des fibres exprimant plusieurs types de myosines</i>	65
6.2.4. <i>Réalignement des coupes immunohistologiques</i>	66
6.3. Analyse par western blots de l'expression des protéines d'intérêt	66
6.3.1. <i>Extraction et quantification des protéines</i>	66
6.3.2. <i>Quantification de l'expression des ARNm par RT-qPCR</i>	68
6.4. Analyse du transcriptome par RNA-seq	69
6.4.1. <i>Définition de la technique « RNA-seq »</i>	69
6.4.2. <i>Méthodes utilisées pour l'analyse RNA-seq</i>	69
6.4.3. <i>Liste des gènes dont les changements sont les plus importants</i>	71
6.4.4. <i>Les logiciels dédiés à l'analyse RNA-seq</i>	71
6.5. Modélisation de la force maximale volontaire isométrique.....	72
6.6. Analyse par Imagerie à Résonance Magnétique (IRM).....	75
6.7. Analyse des propriétés viscoélastique du Rectus Femoris avec le MyotonPro©	75
7. Statistiques.....	77
8. Résultats de l'étude d'immersion sèche de 3 jours.....	78
8.1. Une perte rapide du poids de corps après seulement 3 jours de DI	78
8.2. Changements structuraux du <i>Vastus Lateralis</i> après 3 jours d'immersion sèche	79
8.2.1. <i>Une atrophie musculaire objectivée</i>	79
8.2.2. <i>Changements myotypologiques après 3 jours d'immersion sèche</i>	80
8.2.3. <i>Apparition précoce de co-expression de différents types de myosines dans les fibres musculaires</i>	81
8.3. Altérations fonctionnelles du muscle quadriceps.....	82
8.3.1. <i>Diminution de la force maximale isométrique volontaire et altération de la cinétique de montée en force</i>	82
8.3.2. <i>Altérations de la force maximale isométrique volontaire lors de la phase de relaxation</i>	83
8.4. Des modifications macroscopiques du Quadriceps après seulement 3 jours de DI.....	84
8.5. Effets de 3 jours d'immersion sèche sur l'adiposité musculaire.....	85
8.5.1. <i>Approche macroscopique</i>	85
8.5.2. <i>Effets de 3 jours d'immersion sèche sur les mécanismes de l'adipogenèse ectopique musculaire</i>	85
8.5.3. <i>L'immersion sèche promeut la prolifération des FAPs</i>	88
8.5.4. <i>L'immersion sèche n'altère pas les marqueurs de la fibrose</i>	89

8.6. Altérations des propriétés viscoélasticité du Rectus femoris : raideur, tonus et élasticité musculaire	89
8.7. Marquage indirect du processus de dénervation	91
8.8. Quantification des niveaux d'expression protéique par Western-blot	92
8.8.1. Modifications de la balance protéique	92
8.8.2. Modifications dans la mitochondriogénèse	93
8.9. Analyse du transcriptome par RNA-Seq	94
8.9.1. Analyse globale des RNA-seq	94
8.9.2. Tri des gènes en fonction de leurs variations d'expressions ($\text{Log}_2 \text{Fold-Change}$)	94
8.9.3. Effet de l'immersion sèche sur le transcriptome humain	95
8.9.4. Identification des voies canoniques	97
9. Discussion	98
<i>Publication scientifique de l'étude</i>	103

CHAPITRE 3 : ÉVALUATION D'UNE CONTREMESURE LORS DE DEUX PROTOCOLES DE REDUCTION D'ACTIVITE PROLONGEE.....119

<i>Préambule</i>	120
1. Présentation des protocoles expérimentaux	123
1.1. Le protocole de réduction d'activité de 20 jours	123
1.2. Chronogramme de l'expérimentation	124
1.3. Protocole d'alitement prolongé de 60 jours :	124
1.4. Extrait du chronogramme du protocole expérimental de l'alitement prolongé	125
2. Les conditions de participation aux études expérimentales	127
2.1. Les critères d'inclusion et exclusion du protocole de réduction d'activité et de l'alitement prolongé	128
2.1.1. Les critères d'inclusion de l'étude	128
2.1.2. Les critères d'exclusion de l'étude	129
3. Données anthropométriques et répartition des participants	130
3.1. Données anthropométriques du protocole de réduction d'activité de 20 jours	130
3.2. Données anthropométriques des 10 sujets participant à la première session d'alitement prolongé de 60 jours	131
4. Méthodologie des deux protocoles expérimentaux	132
4.1. Biopsies musculaires et immunohistochimie	132
4.2. Extraction et quantification de l'expression protéique	133
5. Résultats des protocoles expérimentaux	135
5.1. Effets de la réduction d'activité	135
5.1.1. Augmentation de la masse grasse	135
5.2. Effets de l'alitement prolongé	137
5.2.1. Données anthropométriques	137
5.2.2. Les effets de l'alitement prolongé sur le poids corporel des sujets	138
5.2.3. Effets de l'alitement prolongé sur l'évolution de la masse grasse	139
5.3. Évaluation du degré d'atrophie et de la myotypologie après 20 jours de réduction d'activité ..	140
5.3.1. Atrophie musculaire	140

5.3.2. Analyse de la distribution globale des fibres.....	141
5.4. Évaluation de l'aire de section par types de fibres musculaires après 21 jours de réduction d'activité.....	144
5.4.1. Évaluation de la CSA des fibres de type I.....	144
5.4.2. Analyse de la distribution des fibres de type I.....	145
5.4.3. Évaluation de l'aire de section des fibres exprimant MyHC II.....	146
5.4.4. Analyse de la distribution des fibres musculaires exprimant MyHC IIa.....	147
5.4.5. Changements myotypologiques dus à la réduction d'activité.....	148
5.5. Caractérisation du déconditionnement musculaire après 60 jours d'alitement prolongé avec et sans contremesure.....	150
5.5.1. Atrophie musculaire.....	150
5.5.2. Changements myotypologiques.....	151
5.6. Étude de protéines clés de la balance protéique.....	154
5.6.1. Protocole de réduction d'activité.....	154
5.6.2. Protocole d'alitement prolongé.....	154
5.7. Analyse de la mitochondriogénèse.....	155
5.7.1. Protocole de réduction d'activité.....	155
5.7.2. Protocole d'alitement prolongé.....	156
6. Conclusion.....	157
Publication scientifique de l'étude.....	159

CHAPITRE 4 : DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES188

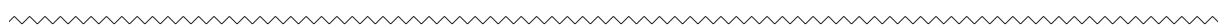
Atrophie et déconditionnement musculaire.....	190
Déconditionnement et balance protéique musculaire.....	191
Altérations de la force et des propriétés viscoélastique du quadriceps.....	192
Changements myotypologiques :.....	192
Déconditionnement musculaire et remodelage de la jonction neuromusculaire.....	193

ANNEXES195

Curriculum Vitae.....	196
Modélisations mathématiques des tests de force maximale isométrique volontaires des sujets d'immersion sèche.....	203
Chronogramme entier de l'alitement prolongé de 60 jours s'étant déroulé de Janvier 2017 / Avril 2017.....	210
Publication scientifique en collaboration dans le laboratoire.....	219
Protocole d'automatisation du calcul de l'aire de surface de section des fibres musculaires...	294
Liste des communications.....	311

RÉFÉRENCES315

Liste des abréviations



4EBP1 :	eIF4E binding protein 1
ARNm	Acide Ribonucléique messenger
Akt	Protein kinase B
AMP/ADP/ATP	Adenosine Mono/Di/Tri-Phosphate
AMPK	AMP-activated protein kinase
Atg	Autophagy related Gene
BMR	Basal Metabolite Rate
BR	Bedrest
C/EBPs	CCAAT-enhancer-binding proteins
CeSig	Cell Signaling (Fournisseur anticorps)
CD	Cluster differentiation
CSA	Aire de section transversale
CKT	Cocktail
CTL	Contrôle
CTX	Cardiotoxine
DI	Dry immersion / Immersion sèche
EDL	<i>Extensor digitorum longus</i>
EiF3f	Eukaryote initiation factor 3f
FOXO	Forkhead box class O
Gz	Vecteur vertical
HDBR	Head Down BedRest
HDT	Head Down Tilt bedrest
HU	Hindlimb unloading
IMAT	InterMuscular Adipose Tissue
IRM	Imagerie par résonance magnétique
KO	Knock-out
MAFbx	Muscle atrophy F-box ou Atrogin1
Mdx	X-linked muscular dystrophy
MEDES	Clinique spatiale, Toulouse
mRNA	ARN messagers
MTORC1/2	Mammalian target of rapamycin complex 1/2
mTOR	Mammalian target of rapamycin
MuRF1	Muscle ring finger 1

MyHC	Myosin Heavy Chain
MVC	Maximal Voluntary Contraction
NCAM	Neural Cellular Adhesion Molecule
NF-κB	Nuclear Factor-kappa B
PBS	Phosphate buffer saline
PDGFR	Platelet-derived growth factor receptor
PI3K	Phosphoinositide 3 kinase
RF	Rectus Femoris
S6K1	p70 S6 kinase 1
SUP	Système ubiquitine-protéasome
Thr	Thréronine
Tyr	Tyrosine
Ub	Ubiquitine
ULK1	unc-51 like autophagy activating kinase
ULLS	Unilateral Limb suspension
VL	<i>Vastus Lateralis</i>

Liste des figures



Figure 1 - Les modèles expérimentaux du déconditionnement musculaire	6
Figure 2 – Distribution des fluides et pression artérielle (mmHg) sur Terre, en impesanteur, lors de l'alitement horizontal et de l'alitement à -6°. Extrait de (Hargens & Vico, 2016)	8
Figure 3 – Représentation des vecteurs de gravité sur l'Homme en condition terrestre, en alitement HDT -6° et en contexte d'impesanteur (Hargens & Vico, 2016).....	9
Figure 4 - Illustration d'un sujet lors d'une expérimentation d'alitement prolongé de 60 jours, Toulouse, 2017 (Source : site internet MEDES).....	10
Figure 5 - Modèle expérimental humain d'immersion sèche (Dry Immersion).....	15
Figure 6 - Modèle expérimental humain de suspension unilatérale du membre inférieur	16
Figure 7 – Schéma anatomique de l'innervation de la partie postérieure du membre inférieur.....	18
Figure 8 – Modèle expérimental de suspension du train arrière chez la souris.....	18
Figure 9 - Évolution de la masse musculaire chez l'homme et la femme (adapté de Malina & Bouchard 1991).....	21
Figure 10 - Évolution de la force musculaire chez des sujets entraînés et non entraînés (Adapté de Willmore & Costill 1994).....	22
Figure 11 - Diagramme représentant les mécanismes physiologiques de l'adaptation des muscles à l'impesanteur (Kozlovskaya, 2007)	23
Figure 12 – Diminution de la masse du soleus (modèle rat) lors d'une réduction chronique d'activité (modèle de suspension du train arrière) (Cros <i>et al.</i> , 1999)	24
Figure 13 – Pourcentage d'évolution de la raideur musculaire dans le Tibialis Anterior après 1 jour, 3 jours et 6 jours d'immersion sèche (Kozlovskaya, 2007)	25
Figure 14 – Evaluation de la force maximale volontaire (MVC) : comparaisons des résultats dans différentes études (vol spatial, bed rest, immobilisation (IM), et suspension unilatérale (ULLS) de la jambe (Baldwin <i>et al.</i> , 2013)	26
Figure 15 - Evaluations des sections transversales des groupes musculaires et des muscles : comparaisons des résultats dans différentes études (vol spatial, bed rest, immobilisation (IM), et suspension unilatérale (ULLS) de la jambe (Baldwin <i>et al.</i> , 2013)	27

Figure 16 – Evaluation des sections transversales des fibres musculaires : comparaisons des résultats dans différentes études (vol spatial, bed rest, immobilisation (IM), et suspension unilatérale (ULLS) de la jambe (Baldwin <i>et al.</i> , 2013)	28
Figure 17 – Diminution disproportionnelle de force et de section transversale des muscles lors du vieillissement (Matthew J Delmonico, Harris, Visser, Park, Conroy, Velasquez-Mieyer, Boudreau, Manini, Nevitt, Newman, & Goodpaster, 2009) et suite à une expérimentation de bed rest de 3 mois (Trappe <i>et al.</i> , 2004)	30
Figure 18 - Impact de la microgravité sur la myotypologie chez l'animal (Sandona <i>et al.</i> , 2012).....	32
Figure 19- Pourcentage d’atrophie des fibres musculaires (par type) après des expérimentations de vol spatial, d’alitement prolongé, d’immobilisation et d’ULLS (Adams <i>et al.</i> , 2003).	33
Figure 20 - Illustration de la localisation des IMAT au sein de l’environnement musculaire	34
Figure 21 - Corrélations entre contenu en IMAT et avancée en âge/sensibilité à l’insuline.....	36
Figure 22 - Corrélations entre le degré d’atrophie des fibres musculaires et l’accumulation d’infiltrations graisseuses dans une expérimentation d’hypoactivité (Manini <i>et al.</i> , 2007).....	37
Figure 23 - Voies majeures impliquées dans la maintenance de la jonction neuromusculaire (Rudolf, Deschenes, & Sandri, 2016)	38
Figure 24 - Variation de la balance protéique en condition de réduction d’activité (Atherton <i>et al.</i> , 2016).....	40
Figure 25 - Le système ubiquitine-protéasome (Bonaldo & Sandri, 2013)	41
Figure 26 - PI3K/Akt/mTOR : principale voie de synthèse protéique	46
Figure 27 - Schéma du protocole expérimental de l'immersion sèche (DI)	54
Figure 28 - Chronogramme détaillé de l’arrivée des sujets à la clinique jusqu’à leur départ du protocole expérimental de l’immersion sèche de 3 jours.	59
Figure 29 - Représentation immunohistologique des différentes étapes du protocole technique pour identifier l’aire de section des fibres musculaires	64
Figure 30 - Identification des fibres dites hybrides co-exprimant de plusieurs isoformes de myosines.	65
Figure 31 – Superposition de coupes sériées immunohistologiques	66

Figure 32 - Représentation du logarithme binaire	70
Figure 33 – Méthode de modélisation des tests de force maximale volontaire isométrique.....	73
Figure 34 – Modélisations (signal rouge) des tests de contraction maximale volontaire isométrique (signal noir) concernant le sujet E.....	74
Figure 35 - Effet de 3 jours d'immersion sèche sur le degré d'atrophie global.....	79
Figure 36 - Effet de 3 jours d'immersion sèche sur les fibres de type oxydatif	80
Figure 37 – Changements myotypologiques après 3 jours d'immersion sèche : apparition de fibres musculaires dites hybrides.....	81
Figure 38 – Modélisation de la force maximale isométrique volontaire du quadriceps avant et après 3 jours d'immersion sèche.....	83
Figure 39 – Analyse des constantes relatives à la phase de relaxation	84
Figure 40 – Mesure de l'aire de section du quadriceps par imagerie à résonance magnétique avant et après 3 jours d'immersion sèche	84
Figure 41 - Contenu adipeux intramusculaire (%) mesuré dans la cuisse par IRM	85
Figure 42 - Augmentation des IMAT	86
Figure 43 – Changements d'expression des marqueurs clés adipogéniques.....	87
Figure 44 - Quantification du marqueur de surface PDGFR α des progéniteurs fibro-adipeux (FAPs).....	88
Figure 45 - Changements dans les niveaux d'expressions des marqueurs clés de la fibrose après 3 jours de DI.....	89
Figure 46 – Évaluations des propriétés viscoélastiques du <i>Rectus Femoris</i> mesurée avec le MyotonPro®.....	90
Figure 47 - Apparition précoce de fibres musculaires dénervées identifiées avec le marqueur NCAM/CD56	91
Figure 48 - Variations de l'expression protéique des acteurs principaux de la balance protéique mesurée par western-blot.....	92

Figure 49 - Variations de l'expression protéique des acteurs principaux de la mitochondriogénèse mesurée par western-blot.....	93
Figure 50 – MA-plot du transcriptome après 3 jours d'immersion sèche.....	94
Figure 51 - Distribution du nombre de gènes up- ou down-régulés exprimée en Log ₂	95
Figure 52 - Heatmap représentant l'expression des gènes significativement régulés par un fold change [0.6] lors de l'immersion sèche. Réalisé avec Genepattern®, software.	96
Figure 53 - Voies canoniques représentant l'interaction des gènes significativement régulés présent dans le muscle squelettique après 3 jours d'immersion sèche	97
Figure 54 - Protocole expérimental de la prise du cocktail durant la réduction d'activité.....	123
Figure 55 - Protocole expérimental de la réduction d'activité de 20 jours	124
Figure 56 - Protocole du bedrest de 60 jours.....	125
Figure 57 – Extrait du chronogramme détaillé du protocole expérimental de l'alitement prolongé de 60 jours	126
Figure 58 - Photo issue d'une communication avec les 10 sujets de l'alitement prolongé de 60 jours à Toulouse avec Thomas PESQUET lors de sa mission spatiale.....	127
Figure 59 – Méthode de sélection des sujets	128
Figure 60 - Évolution du pourcentage de masse grasse après le protocole de réduction d'activité de 20 jours.	137
Figure 61 - Évolution du poids corporel durant l'alitement prolongé sur tous les sujets de la première session	139
Figure 62 – Évolution du pourcentage de masse grasse durant l'alitement prolongé sur tous les sujets de la première session.....	140
Figure 63 - Analyse morphométrique du degré d'atrophie.....	141
Figure 64 – Distribution globale des fibres musculaires avant et après 20 jours de réduction d'activité	142
Figure 65 - Distribution globale des fibres musculaires avant et après 20 jours de réduction d'activité des sujets du groupe contrôle	143

Figure 66 - Distribution globale des fibres musculaires avant et après 20 jours de réduction d'activité des sujets du groupe cocktail.....	143
Figure 67 - Aire de section des fibres musculaires exprimant MyHC I du groupe Contrôle (CTL) et Cocktail (CKT).....	144
Figure 68 – Distribution des fibres musculaires de type 1 du groupe Cocktail	145
Figure 69 – Distribution des fibres musculaires de type 1 du groupe Contrôle.....	146
Figure 70 – Aire de section des fibres musculaires de type MyHC IIA du groupe Contrôle (CTL) et Cocktail (CKT).....	147
Figure 71 - Répartition des fibres musculaires exprimant MyHC Iia des sujets du groupe "Cocktail"	147
Figure 72 - Répartition des fibres musculaires exprimant MyHC Iia du groupe "Contrôle".....	148
Figure 73 - Évolution de la myotypologie après une réduction d'activité de 20 jours	149
Figure 74 – Illustration des fibres hybrides.....	149
Figure 75 - Évaluation de l'atrophie musculaire globale après 60 jours d'alitement prolongé de 60 jours	150
Figure 76 - Évaluation de l'atrophie musculaire globale après 60 jours d'alitement prolongé.....	151
Figure 77 - Évolution de l'aire de sections des différents types de fibres musculaires durant l'alitement prolongé de 60 jours	152
Figure 78 - Évolution de la myotypologie suite à 60 jours d'alitement prolongé.....	152
Figure 79 - Analyse de la distribution des fibres musculaire de type I et IIA.....	153
Figure 80 - Analyse de l'expression de la balance protéique.....	154
Figure 81 - Analyse de l'expression de la balance protéique.....	155
Figure 82 - Analyse de l'expression de la mitochondriogénèse.....	155
Figure 83 - Analyse de l'expression de la mitochondriogénèse.....	156

Liste des tableaux



Tableau 1 - Comparaison des changements physiologiques induits dans les vols spatiaux et dans le l'alitement prolongé (Nicogossian, 1994)	11
Tableau 2 - Données anthropométriques des 12 sujets participants à l'immersion sèche de 3 jours ...	58
Tableau 3 - Liste des anticorps utilisés pour la myotypologie et la dénervation.	62
Tableau 4 - Liste des anticorps utilisés lors de cette étude.....	67
Tableau 5 - Liste des amorces utilisées en RT-qPCR lors de l'expérience d'immersion sèche.....	68
Tableau 6 - Liste des gènes dont les changements d'expression sont les plus significatifs.....	71
Tableau 7 - Données anthropométriques des sujets avant et après 3 jours d'immersion sèche.....	78
Tableau 8 - Données anthropométriques des sujets du protocole de réduction d'activité de 20 jours	131
Tableau 9 - Données anthropométriques des 10 sujets participants à la première session de l'alitement prolongé de 60 jours	132
Tableau 10 - Liste des anticorps utilisés pour le marquage des isoformes MyHC	133
Tableau 11 - Liste des anticorps utilisés dans l'étude d'alitement prolongé de 60 jours	134
Tableau 12 - Données anthropométriques des sujets Contrôle après 21 jours de réduction d'activité	135
Tableau 13 – Données anthropométriques des sujets Cocktail après 20 jours de réduction d'activité	136
Tableau 14 - Données anthropométriques des sujets Contrôle de la première session d'alitement prolongé de 60 jours à Toulouse	137
Tableau 15 - Données anthropométriques des sujets Cocktail de la première session d'alitement prolongé de 60 jours à Toulouse	138

Avant-propos



La plasticité du tissu musculaire se définit au travers de son importante capacité d'adaptation à différents niveaux de sollicitations et de contraintes fonctionnelles, et s'illustre principalement, au niveau macroscopique, par des variations, en gain ou en perte, de notre masse musculaire, associées à des modifications de ses caractéristiques fonctionnelles, comme un gain de force par exemple.

Au niveau microscopique, de vastes restructurations cellulaires et modifications métaboliques sont continuellement initiées en réponse aux différentes contraintes mécaniques et environnementales rencontrées. La plasticité musculaire repose en grande partie sur l'équilibre ou non de la balance protéique, c'est à dire l'équilibre entre les processus anaboliques et cataboliques, responsable de l'homéostasie musculaire, et engendrant ainsi un équilibre et une régulation fine de notre masse musculaire. Ces mécanismes de protéosynthèse et de protéolyse, régulés par différentes voies de signalisation, sont initiés par une multitude de facteurs incluant le stress mécanique, l'activité contractile, la biodisponibilité en nutriments ou encore de nombreuses hormones.

Dès la naissance, le tissu musculaire représente environ 25% du poids corporel, puis ce pourcentage va s'accroître jusqu'à l'âge adulte où il atteindra en moyenne le pourcentage de 40%. Chez les filles et les garçons, la croissance de la masse musculaire est identique jusqu'à la période de la puberté, où elle atteint en moyenne une masse de 23kg. Cette augmentation de masse musculaire est corrélée à l'augmentation de la force. Dès l'âge de 30 ans en moyenne, la masse musculaire tend à décroître. Entre 40 et 80 ans, le déclin de la masse musculaire opéré par l'avancé en âge est d'environ de 30 à 50% soit de 3 à 8% par décennie.

En parallèle aux processus naturels de croissance et de vieillissement, certains facteurs vont influencer les variations de masse musculaire, en exacerbant les gains ou au contraire les pertes de masse musculaire. Dans le contexte d'une réduction chronique des sollicitations fonctionnelles, lors d'un alitement clinique, lors de l'immobilisation d'une articulation suite à une fracture osseuse, lors d'un séjour en impesanteur, ou tout simplement dans le cas de comportements sédentaires, le système musculaire va alors subir un déconditionnement, défini principalement par une perte de masse et de force musculaire, et une fatigabilité accrue. Ces processus sont le plus souvent réversibles ou peuvent être évités ou atténués au travers de l'efficacité de certaines contremesures comme l'exercice physique ou les stimulations mécaniques et nerveuses, l'alimentation et les suppléments alimentaires.

Chapitre 1 : Revue de la littérature

Préambule

Lorsque nos muscles ne sont plus sollicités à un niveau suffisant, ceux-ci subissent un déconditionnement. Il faut ainsi distinguer le déconditionnement musculaire dit primaire ; du déconditionnement musculaire dit secondaire. De manière générale, le déconditionnement primaire est fortement lié aux conditions d'inactivité musculaire rencontrées lors d'alitement prolongé (séjours hospitaliers ou grossesse pathologique par exemple), lors d'immobilisation d'une ou plusieurs articulations à la suite d'une blessure, lors d'une exposition à un environnement en impesanteur, ou tout simplement en conséquence d'un style de vie sédentaire. Par ailleurs, le déconditionnement musculaire secondaire est quant à lui associé à des maladies chroniques telles que le cancer, le diabète de type 2, la broncho-pneumopathie obstructive ou encore de nombreuses myopathies.

Depuis des décennies, que ce soit dans le secteur spatial ou celui de la santé et de la réhabilitation, les scientifiques ont eu l'opportunité d'étudier les effets de la réduction d'activité et de l'impesanteur, de définir le déconditionnement musculaire et ses conséquences, mais aussi d'évaluer les effets préventifs de plusieurs contremesures. Ainsi, en parallèle aux études qui ont pu être effectuées en situations d'impesanteur réelle (vol en orbite, séjour dans la station spatiale internationale, ISS), qui, de manière logique, restent rares, les scientifiques ont utilisé et validé des modèles expérimentaux de simulation au sol et de réduction chronique d'activité. Que ce soit à travers des modèles expérimentaux de types cellulaires, animaux ou humains, la communauté scientifique a largement contribué aux avancées scientifiques et a apporté une multitude d'informations concernant la recherche sur le système musculo-squelettique à travers divers modèles illustrés en Figure 1 (Fitts, Riley, & Widrick, 2000; Trappe *et al.*, 2009).

Ce premier chapitre se compose ainsi de deux grandes parties : l'une décrivant les différents modèles expérimentaux utilisés et sur lesquels la littérature scientifique est principalement basée ; l'autre sur la définition du déconditionnement musculaire et les principaux types de contremesures étudiées.

**Partie 1 : Modèles expérimentaux d'étude
du déconditionnement musculaire en
impesanteur réelle ou simulée**

1. Expérimentations en situation d'impesanteur réelle

Les expérimentations sur l'étude des effets de l'impesanteur réelle sur le système musculaire concernent majoritairement des études chez le rongeur et chez l'humain, dans des conditions de vol en orbite autour de la terre, soit lors de séjours de courtes ou longues durées sur la station spatiale internationale (ISS), soit lors de vol à bord de satellite, BION par exemple. Les vols paraboliques sont aussi un mode expérimental intéressant mais offrant de trop courtes durées en situation d'impesanteur pour effectuer un travail d'étude au niveau cellulaire (Van Ombergen *et al.*, 2017).

Des programmes basés sur les sciences de la vie comme Spacelab ont inclus de nombreuses expérimentations impliquant des astronautes, mais également des animaux et des insectes (Fitts *et al.*, 2010; Roffino *et al.*, 1998). D'autres expériences, conduites grâce au programme BION, d'abord soviétique puis russe, représentent une série de missions de satellites scientifiques lancés par une fusée Soyouz depuis le cosmodrome de Baïkonour dans le nord de la Russie et placé sur une orbite à 575 kilomètres d'altitude. Après une douzaine de missions réalisées entre 1966 et 1996 incluant des collaborations internationales, y compris avec les Etats-Unis pendant la guerre froide, le programme était de nouveau actif en Russie en 2005 et rebaptisé le programme BION-M. La première mission, BION-M1, réalisée en 2013 a consisté en un vol spatial de 30 jours et a emporté des souris, des gerbilles, des escargots et des poissons. Ce programme a d'ores et déjà engendré de nombreuses publications scientifiques, notamment des résultats obtenus chez la souris, examinant les effets d'un séjour spatial prolongé sur les différentes fonctions physiologiques (Berg-Johansen *et al.*, 2016; Gritsyna *et al.*, 2015; Islamov *et al.*, 2014; Naumenko *et al.*, 2015; Novoselova *et al.*, 2015; Ogneva *et al.*, 2015; Ogneva, Maximova, & Larina, 2014; Popova *et al.*, 2015; Proshchina, Krivova, & Saveliev, 2015; Sofronova *et al.*, 2015; Tsybko *et al.*, 2015; Ulanova *et al.*, 2015).

La station spatiale internationale (ISS) offre actuellement les plus grandes opportunités de réaliser des expériences d'impesanteur réelle. La station, qui vole à 400 kilomètres du sol avec une vitesse de 28800 km/h, met 90 minutes pour faire un cycle complet autour de la Terre. Ainsi, les astronautes vivant et travaillant à bord de l'ISS sont sujets à pas moins de 16 levers et couchers de soleil par jour. En subissant une gravité de $8,7 \text{ N.kg}^{-1}$, L'ISS permet, encore aujourd'hui, de fournir l'opportunité de travailler sur les effets à court et à long terme

de l'environnement en impesanteur. De nombreuses études ont déjà démontré la considérable variabilité dans les proportions de perte de masse musculaire et de perte fonctionnelle parmi les astronautes (Fitts *et al.*, 2000; Trappe *et al.*, 2009). Le système « Mice Drawer » à bord de l'ISS permet également d'accueillir des souris et a donc donné l'opportunité de travailler sur les conséquences de 91 jours d'impesanteur réelle (Cancedda *et al.*, 2012; Sandona *et al.*, 2012).

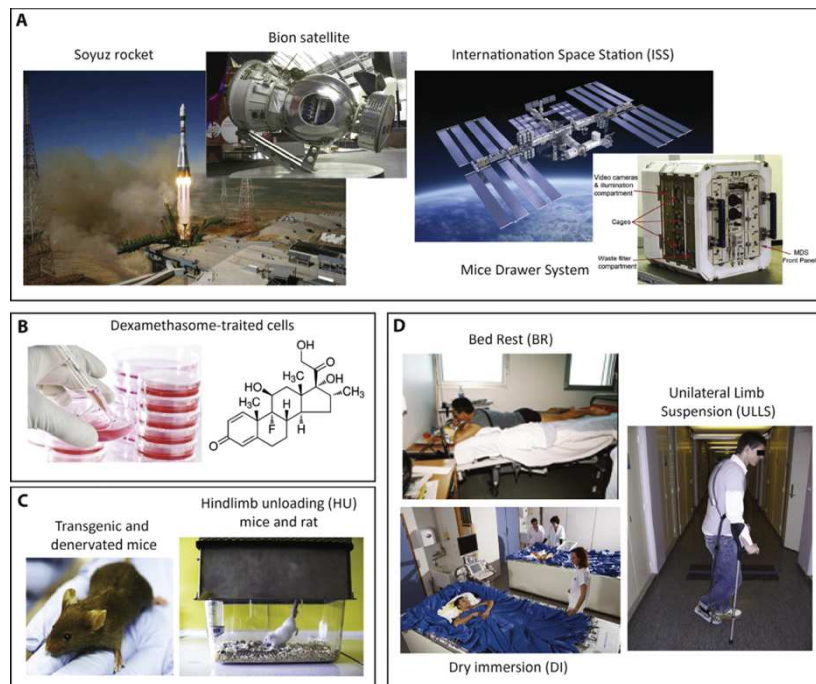


Figure 1 - Les modèles expérimentaux du déconditionnement musculaire

A) Dispositifs liés aux expérimentations d'impesanteur, B) Expérimentations sur cultures cellulaires, C) Modèles animaux d'impesanteur simulée, d'hypoactivité et d'avancée en âge, D) Modèles humains d'impesanteur simulée et d'hypoactivité. Extrait de Brioche et al. (2016).

2. Expérimentations en impesanteur simulée

En raison du manque d'opportunités de vols spatiaux, de leurs coûts élevés, du nombre restreint des membres d'équipage, les expérimentations de simulations se sont avérées indispensables pour mieux comprendre les mécanismes d'adaptation des différents tissus aux vols spatiaux, ainsi que les adaptations physiologiques. Les femmes ne représentant que 10 à 20% des membres d'équipages de vols spatiaux, les expérimentations de simulations permettent également de travailler sur ces sujets et d'en connaître les spécificités (Chopard, Lecunff, *et al.*, 2009). Plusieurs modèles expérimentaux utilisés chez l'être humain sain permettent d'induire un déconditionnement musculaire.

Ils sont pour la plupart dédiés à étudier les mécanismes impliqués dans les différentes situations impliquant l'inactivité musculaire mais sont également utilisés afin d'identifier et d'évaluer différentes contremesures afin de lutter contre ces effets néfastes. Les études conduites chez l'homme sain se sont principalement centrées sur l'utilisation de l'alitement prolongé avec déclivité (Pavy-Le Traon *et al.*, 2007), du modèle de suspension unilatérale de la jambe (ULLS pour Uni-Lateral Limb Suspension) (Hackney & Ploutz-Snyder, 2012), ou encore d'immersion sèche (DI pour Dry Immersion) (Demangel *et al.*, 2017; Navasiolava *et al.*, 2011).

2.1. Modèle d'alitement prolongé avec déclivité

L'alitement prolongé avec déclivité ou *Head down tilt bed rest* (HDBR) s'est révélé comme un modèle valide pour mimer les effets physiologiques des vols spatiaux (Figure 2) (Hargens & Vico, 2016). Ce modèle induit un alitement prolongé avec une déclivité de -6° degrés, tête en bas. En plus d'étudier les changements physiologiques induits, les différentes études utilisant le HDBR ont porté principalement sur l'évaluation de contremesures, avec des résultats encourageants mais toujours limités (exercice en résistance, nutrition, centrifugation). Cependant, même si l'alitement prolongé peut reproduire ou simuler une impesanteur réelle concernant la pression artérielle ou encore la répartition des fluides ; il ne faut pas exclure que les effets retrouvés en HDBR sont très différents de ceux de l'impesanteur réelle (Figure 2B).

Les études sur l'alitement prolongé ont fourni des idées uniques et innovantes sur la physiologie du « non-poids » induit par l'impesanteur, et du déconditionnement de l'organisme, qu'il soit musculaire, vestibulaire, ou encore cardiaque. La physiologie de l'alitement prolongé et son utilité à l'impesanteur ont été largement revues et documentées par Conley dans le milieu des années 1990 (Conley *et al.*, 1996) et il y a une décennie par Pavy-Le Traon et al (Pavy-Le Traon *et al.*, 2007).

Le HDBR se caractérise par une situation d'inactivité, de confinement, l'élimination des stimuli gravitationnels verticaux, ainsi qu'une déclivité. Ces paramètres induisent une répartition accrue des fluides vers le haut du corps, un déchargement du poids vertical du corps, une diminution de travail contre la gravité, réduisant alors les besoins en énergie. De manière globale, en parallèle au déconditionnement musculaire rapide associé à ce modèle d'étude qui sera décrit dans la partie 2 de ce chapitre, l'alitement chronique et les

changements de répartition des fluides vers le haut du corps induisent également une réduction de 10 à 15% du volume plasmatique, une densité osseuse diminuée, et des rythmes circadiens souvent perturbés (Dijk *et al.*, 2001; Grigoriev *et al.*, 1992). La réduction significative du volume plasmatique conduit à un ensemble de changements cardiovasculaires, notamment des changements de performance cardiaque et une capacité aérobie réduite identiques aux observations dans l'espace (Convertino & Sandler, 1995).

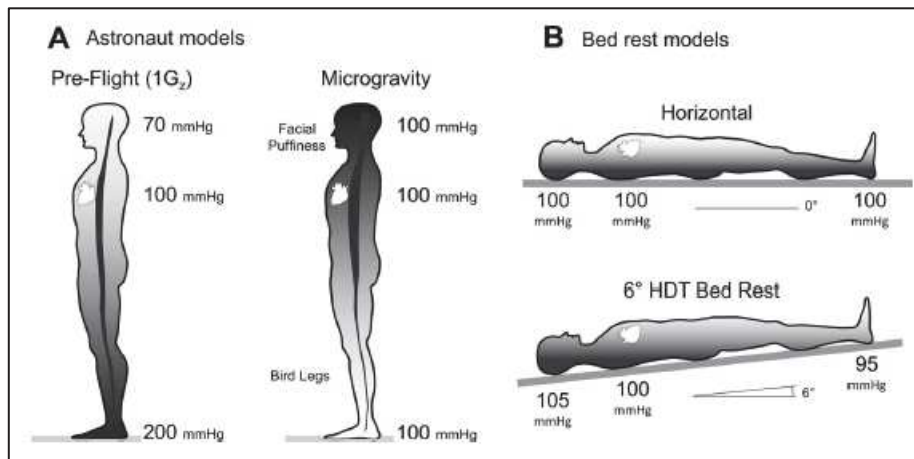


Figure 2 – Distribution des fluides et pression artérielle (mmHg) sur Terre, en impesanteur, lors de l'alitement horizontal et de l'alitement à -6° . Extrait de (Hargens & Vico, 2016)

*A : Pressions artérielles (mmHg) en position debout sur Terre (gauche) et en impesanteur (droite).
B : Pressions artérielles lors d'un alitement horizontal (haut) et lors d'un alitement HDT à -6° (bas).*

Une caractéristique non négligeable des expérimentations en alitement prolongé (cas de la

Figure 3 et Figure 4) est que les bénévoles sont autorisés et peuvent se déplacer, bouger sur un coude pour manger ou encore boire. Cet aspect de mobilité modifie donc les mouvements avec le cou et le chargement de la tête dans l'espace et de la position verticale sur Terre. De plus, l'exercice physique, la douche et les activités de gestion des déchets corporels doivent être effectués dans une position horizontale ou HDT stricte afin de maintenir la fidélité de la simulation de l'impesanteur. Dans la position horizontale ou HDT, les os, la plupart des muscles et le cœur fonctionnent beaucoup moins contre la force de gravité dans la direction verticale (G_z) par rapport à l'activité verticale normale sur Terre.

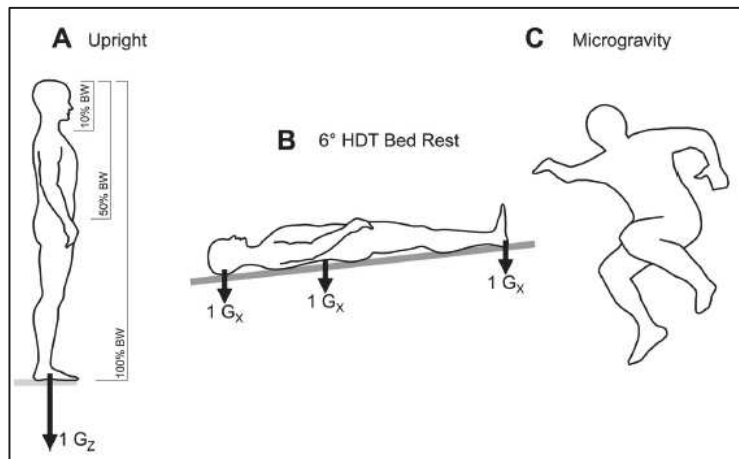


Figure 3 – Représentation des vecteurs de gravité sur l’Homme en condition terrestre, en alitement HDT -6° et en contexte d’impesanteur (Hargens & Vico, 2016)

A : la posture verticale sur terre fournit un vecteur de 1G (vertical) de la tête aux pieds avec environ 10% de poids corporel (BW) au niveau du cou, environ 50% du poids du corps au centre de masse (colonne lombaire) et 100% du poids de corps en bas des pieds. B : dans un lit incliné de 6 degrés, le vecteur Gz est perdu, de sorte que le corps s'adapte à un vecteur Gx (vecteur horizontal) en position couchée. C : les astronautes ne subissent aucun vecteur de gravité significatif et le corps s'adapte aux conditions d'impesanteur.

De nombreuses études sur les alitements prolongés devraient être encouragées afin de promouvoir les collaborations et les coopérations internationales, en particulier pour les missions spatiales qui sont de plus en plus coûteuses. Ces études sur l'alitement prolongé offrent des possibilités d'optimiser les tests effectués avant et après l'expérience, la vérification de paramètres de vol importants, ainsi que les conditions de sélection, de nutrition, les activités de repos avant le coucher et les soins généraux aux bénévoles.

Même si les effets retrouvés sont particulièrement similaires, il faut toutefois rappeler que les études d'alitement prolongé ne sont pas précisément un modèle d'excellence pour mimer les vols spatiaux, En effet, ces études n'incluent pas, par exemple, les activités liées au lancement dans l'espace et aux phases d'accélération, à la période d'excitation liée au départ dans l'espace suivie de la période de confinement et d'isolement. Aussi, les conditions de vol pendant les deux premiers jours nécessitent un ajustement dû aux conflits des systèmes visuels et vestibulaires en raison de l'absence d'indices directionnels habituels, des changements de lumière et de pression dans le vaisseau spatial, et peuvent entraîner ce que l'on appelle le mal du mouvement de l'espace.



Figure 4 - Illustration d'un sujet lors d'une expérimentation d'alitement prolongé de 60 jours, Toulouse, 2017 (Source : site internet MEDES).

On identifie l'inclinaison du lit à -6°. On observe également que tout est fait pour que ce séjour soit le plus confortable possible : photos, matériel multimédia, livres etc.

Seules quelques études ont inclus des profils d'accélération de retour sur terre dans leurs protocoles expérimentaux. Au retour de l'espace ou à la réactivation de l'organisme à la gravité après HDBR, les sujets présentent une incidence élevée d'hypotension orthostatique, de problèmes d'équilibre, de traînées de pieds, et d'une mauvaise coordination. Tous ces changements dépendent de mécanismes neuronaux, neurohumoraux et humoraux qui sont affectés de manière très similaire aussi bien dans le HDBR que dans les vols spatiaux. Une comparaison des changements physiologiques induits dans les vols spatiaux et dans l'alitement prolongé est donnée dans le Tableau 1 ci-contre d'après une étude de Nicogossian et collaborateurs (Nicogossian, 1994).

À la suite de ce changement de répartition des fluides se dirigeant vers le haut de l'organisme, la perte de liquide et de sodium (Na) dans l'urine a entraîné une réduction de 10 à 15% du volume plasmatique en fonction de la durée de l'étude et de la méthode utilisée. Cette réduction significative du volume plasmatique conduit à un ensemble de changements cardiovasculaires, notamment des changements de performance cardiaque et une sensibilité baroréflexe et une capacité aérobie réduite identiques à celles de l'espace.

	Espace	Bed rest (HDBR)
Taille	↑ ± 1.3 cm	↑ ± 1.0 cm
Poids	↓ ± 3-4%	↓ ± 2-4%
Capacité maximale aérobie	Non mesuré	↓ 25%
Volume plasmatique	↓ 10-15%	↓ 10-15%
Calcium urinaire	↑	↑
Densité osseuse	↓ 1.6% par mois	↓ 0.5-1% par mois
Absorption calcium dans l'intestin	↓	↓
Risques de calculs rénaux	↑	↑
Masse musculaire	↓	↓
Force musculaire	↓	↓
Résistance à l'insuline	↑	↑
Nausée / Vertige	Aucun 35% Sévère 7% Modérée 23% Léger 35%	Vertige 10% Nausées rarement présentes
	Post-flight	Post-bed rest
Capacité maximale aérobie	↓ ± 12%	↓ ± 20-25%
Hypotension orthostatique	↑	↑
Equilibre/Stabilité	↓	↓
Coordination/	Faible	Faible

Tableau 1 - Comparaison des changements physiologiques induits dans les vols spatiaux et dans le l'alitement prolongé (Nicogossian, 1994)

L'avantage du modèle HDBR réside dans le déchargement du corps entier et l'inactivité relative qui est imposée. Avec l'inclinaison négative, l'alitement prolongé est particulièrement adapté aux investigations musculo-squelettiques et cardiovasculaires intégrées. Cependant, le modèle d'alitement prolongé nécessite beaucoup de ressources (par exemple, des installations spécialisées d'alitement, des douches qui s'adaptent aux lits, des échelles pour peser des sujets couchés, etc.) nécessitant une surveillance infirmière complète (Koryak, 1998). Les études en HDBR restent un des meilleurs modèles que nous avons sur Terre pour mimer les effets de l'impesanteur afin de les étudier. C'est plus particulièrement le meilleur modèle de simulation permettant d'évaluer les contremesures sur la plupart des effets physiologiques des vols spatiaux. C'est pourquoi, même s'il ne comprend pas les effets initiaux et finaux d'une mission spatiale, il n'en demeure pas moins le modèle le plus représentatif de ces expériences en orbite autour de la terre.

2.2. Modèle d'immersion sèche

Le modèle expérimental d'immersion sèche (*Dry Immersion*, DI), d'abord développé et utilisé par des scientifiques russes, est un modèle expérimental validé pour mimer les conditions d'impesanteur et pour entraîner de manière assez drastique, dans un temps restreint, un déconditionnement musculaire (Clement & Pavy-Le Traon, 2004; Grigor'ev, Kozlovskaja, & Shenkman, 2004; S. Iwase, Sugiyama, *et al.*, 2000; Kozlovskaja, 2008; Nicogossian, 1994; E. Shulzhenko *et al.*, 1976; Somody *et al.*, 1999; Watenpaugh & Hargens, 1996). L'avantage considérable de cette technique, par rapport à celle du traditionnel alitement prolongé, est représenté par l'absence de structure de support sous le corps des sujets. Ainsi l'absence de support mécanique crée alors un état plus proche de la situation retrouvée lors d'un environnement en impesanteur (Navasiolava *et al.*, 2011). Les caractéristiques de l'immersion ont été étudiées et mettent en valeur que la profondeur d'immersion est un paramètre important.

Une distinction est faite entre l'immersion « corps entier » ou « immersion profonde » dans laquelle le sujet est immergé jusqu'au cou, et l'immersion « progressive » où le sujet est immergé jusqu'à la zone ombilic-sternum. Dans ce modèle, la température d'immersion peut être soit thermo-neutre (environ 34° C), chaude, tiède ou froide. Concernant l'isolation du sujet dans le bain, elle peut être absente, dans ce cas on parle d'« immersion humide », ou présente, dans ce cas on parle d'« immersion sèche » où le sujet est isolé au moyen d'un tissu imperméable à l'eau. En ce qui concerne le temps d'exposition et d'expérimentation, il dépend principalement du modèle utilisé et lorsqu'il s'agit d'une immersion humide, celle-ci ne dure pas plus de plusieurs heures, alors que pour le modèle d'immersion sèche permet des expérimentations de plusieurs jours.

L'hypokinésie ou réduction de l'activité motrice, et l'hypodynamie ou diminution de la charge musculaire posturale, sont induites dans ce modèle d'immersion sèche qui entraîne rapidement une diminution du tonus musculaire (Grigor'ev *et al.*, 2004; Kozlovskaja, Grigor'eva, & Gevlich, 1984). La chute du tonus des muscles posturaux apparaît dans les premières heures d'immersion, avec des valeurs atteignant jusqu'à -40% et -50%. Ces amplitudes de changements n'étant pas atteintes avec le modèle d'alitement prolongé HDBR (Kovalenko & Gurovsky, 1980).

Le changement de répartition des fluides entraîne une centralisation rapide de ces derniers et une diminution du volume sanguin total. La pression hydrostatique augmente avec la profondeur de l'immersion et agit ainsi davantage sur les surfaces inférieures du corps. Les pressions hydrostatiques internes sont contrebalancées par celles de l'eau environnante indépendamment de la posture tenue par le sujet dans l'eau. La compression hydrostatique induit donc une redistribution rapide des fluides corporels vers la région thoraco-céphalique (Epstein, 1996; Somody *et al.*, 1999).

De nombreuses études, et principalement russes, ont été publiées sur l'immersion dite «humide». Cependant, les études se sont principalement centrées sur l'exposition à très court terme c'est-à-dire de 6 à 9 heures. À notre connaissance, en dehors de celles réalisées dans les installations russes, des études avec immersion sèche ont été également menées en Inde (Modak & Banerjee, 2004) et en Autriche (Berger *et al.*, 2001). Récemment, ce modèle a été exploité en France et a fait l'objet de plusieurs publications dont celle liée aux travaux de thèse présentés ici (Demangel *et al.*, 2017; L. Treffel, Dmitrieva, *et al.*, 2016; Loïc Treffel, Mkhitaryan, *et al.*, 2016).

La principale limitation de la méthode d'immersion humide est la durée des expérimentations qui ne peuvent dépasser 6 à 12 heures. Les premières tentatives pour prolonger le temps d'immersion ont été réalisées en utilisant des solutions de chlorure de sodium ou de silicium isotoniques ou hypertoniques. Ces différentes techniques d'amélioration du milieu d'immersion ont été abandonnées en raison de la macération de la peau par les solutions ainsi que les frais engendrés. En revanche, les expérimentations en immersion sèche sont moins complexes et permettent des temps d'expérimentation plus longs (Leach Huntoon, Grigoriev, & Natochin, 1998). La méthode d'immersion sèche a été proposée dès les années 1970, lors du développement des programmes spatiaux, comme moyen de simuler une impesanteur prolongée.

Les premières expériences d'immersion sèche ont duré 10 heures, et ensuite elles étaient de 3, 7, 13 et 28 jours. Il est important de noter que la durée la plus longue expérimentée est de 56 jours (E. Shulzhenko *et al.*, 1976; EB. Shulzhenko, Vil-Vilyams, IF., 1975a), alors que la plus longue étude d'alitement prolongé est de 370 jours et a été menée sous l'ancien régime Soviétique. Les premières expériences se sont déroulées dans un bain spécialement conçu pour un sujet et rempli d'eau du robinet, avec des dimensions de 2 m x 1 m x 1 m (E.

Shulzhenko *et al.*, 1976; EB. Shulzhenko, Vil-Vilyams, IF., 1975a). Pour l'immersion simultanée de deux sujets, une piscine d'eau d'une superficie de 7,2 m² et une profondeur de 2,1 m a également été utilisée. Actuellement, en Russie, un bain de 2,2 m de long, 1,1 m de largeur et 0,85 m de profondeur est utilisé pour un sujet. La longueur du bain a été augmentée pour éviter un contact accidentel et/ou intentionnel des extrémités du bain avec les pieds. Ceci a pour objectif simple d'éviter de fournir une zone de soutien permettant une quelconque stimulation pour les zones de soutien des pieds et ainsi compromettre les résultats de l'expérimentation.

Alors que les bains pour deux ou trois volontaires sont également disponibles en Russie (Grigor'ev *et al.*, 2004), les chercheurs autrichiens utilisent une piscine ronde pour l'immersion simultanée de plusieurs sujets. Un tissu imperméable élastique, qui dépasse considérablement de la surface de l'eau est attaché autour du bain.

En terme de fonctionnement, les bains ont actuellement un ascenseur intégré pour abaisser et élever les sujets durant l'expérimentation. Le sujet, vêtu de vêtements confortables, est placé sur le tissu étanche après que le tissu ait été recouvert d'un drap en coton pour des raisons d'hygiène. Le sujet est alors abaissé lentement dans l'eau *via* l'ascenseur et son corps est alors progressivement recouvert du tissu formant des plis avec l'eau qu'ils contiennent. Cet ensemble permet ainsi au sujet de se trouver «suspendu librement» dans la masse d'eau, assimilée à un système de flottaison. Selon le protocole expérimental, la profondeur de l'immersion se trouve soit au niveau du cou, soit jusqu'à la ligne imaginaire qui relie les deux aisselles. La tête se trouve ainsi en dehors de la partie immergée. Les sujets sont autorisés à mettre leurs mains à l'extérieur du système qui les recouvre. Cela leur permet ainsi d'avoir accès à un ordinateur, mais aussi et surtout pour leur permettre de manger, de lire et d'effectuer des tâches expérimentales. La température de l'eau est réglée automatiquement et vérifiée par un thermomètre flottant au milieu de la masse d'eau. Cette température réglée sur 32-34.5°C (thermo-neutre) est ajustée pour le confort dans les limites expérimentales et à la demande du sujet (Kozlovskaja, 2008; E. Shulzhenko *et al.*, 1976). La température de l'air est d'environ 24 °C, afin de maintenir l'équilibre thermique lorsque le sujet est retiré du bain. Le sujet reste sous observation médicale constante 24 heures par jour. Pour les examens physiques et les inspections visuelles de la peau, les plis de tissu dus à l'immersion peuvent être déplacés sans modifier les conditions expérimentales. Les enregistrements provenant de n'importe quel site sur le corps peuvent être pris sans risque de mouiller les sondes ou les

électrodes et donc d'endommager le matériel utilisé. L'urine est recueillie dans des sachets cliniques. Le sujet est autorisé quotidiennement à sortir pendant 15 min pour les procédures d'hygiène et pour la pesée corporelle.

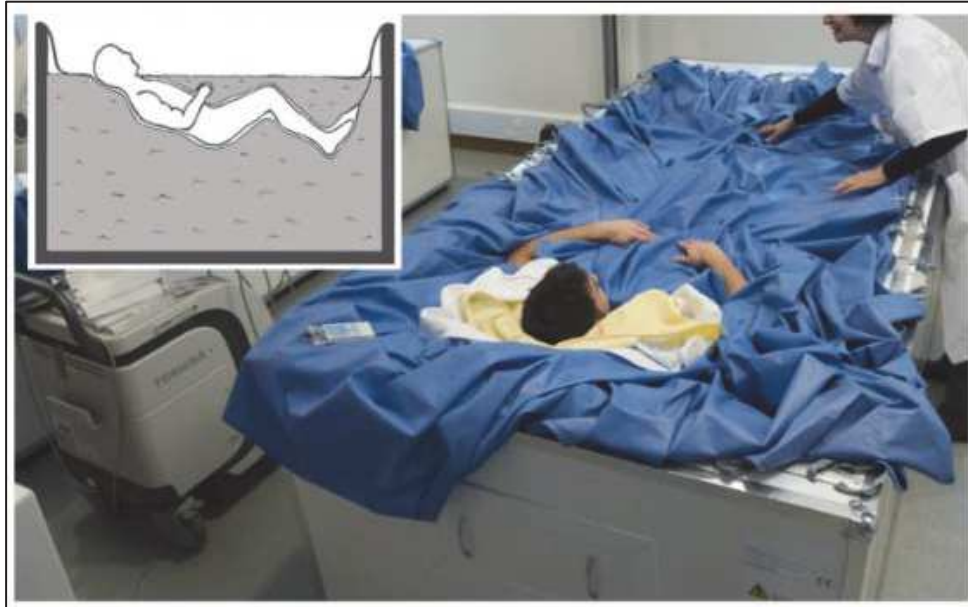


Figure 5 - Modèle expérimental humain d'immersion sèche (Dry Immersion)

La méthode d'immersion sèche consiste à séparer le sujet de l'eau par une bâche thermo-neutre et à l'immerger jusqu'au niveau du cou. Extrait de Navasiolava et al. (2011).

En général, les sujets trouvent l'immersion sèche « confortable » pendant la période initiale (S. Iwase, Sugiyama, *et al.*, 2000; E. Shulzhenko *et al.*, 1976). Le transfert des fluides vers le haut du corps entraîne une sensation de lourdeur de la tête, une légère obstruction du nez et certaines difficultés d'inhalation qui se produisent plus tard. Presque tous les sujets se plaignent de maux et douleurs de dos après les 6-8 premières heures d'immersion sèche. Ces éléments médicaux sont quantifiés par différents tests de douleur (indexé de 0 à 100) pour estimer de manière individuelle le ressenti de chaque bénévole. Ceci serait principalement dû à la perte de tonus dans les muscles du dos, mais cela tend à disparaître à partir du 2^{ème} voire 3^{ème} jour. De manière surprenante, ce mal de dos est particulièrement intense chez les sujets les plus entraînés. La perturbation du sommeil, la perte d'appétit et les diarrhées ont aussi été rapportés dans ces expérimentations (Fomin *et al.*, 1985; Shul'zhenko *et al.*, 1984; E. B. Shulzhenko, 1975b).

Lors d'études concernant plusieurs sujets immergés dans un même bain, certains d'entre eux signalent des symptômes du mal des transports pendant le mouvement de l'eau et pendant les éventuels mouvements respectifs de chacun des sujets (Struhal *et al.*, 2002). Des plaintes

similaires ont été décrites au cours des premiers jours de vol spatial (Egorov, 1996; Kornilova, 1997; Williams *et al.*, 2009) ou d'alitement prolongé (Baum & Essfeld, 1999; Greenleaf, 1984).

2.3. Modèle de suspension unilatérale du membre inférieur

Un autre modèle utilisé sur Terre pour étudier les effets de la réduction chronique d'activité et le déconditionnement musculaire associé est le modèle de suspension unilatérale du membre inférieur (ULLS, *Unilateral Lower limb Suspension*). Ce modèle expérimental consistait initialement à l'utilisation d'une sangle pour suspendre l'un des deux membres inférieurs (H. E.; Berg *et al.*, 1991). Dans ce modèle, le genou est maintenu en flexion pendant l'activité ambulatoire. Une version plus récente utilise une chaussure à plate-forme élevée sur le membre controlatéral pour suspendre la jambe ipsilatérale et induire une réduction d'activité et donc un déconditionnement musculaire (Ferretti *et al.*, 2001) (Figure 6B). Dans ce modèle, le membre suspendu est en position anatomique et peut librement se mouvoir. Pour chacun des deux modèles, l'activité ambulatoire se fait en utilisant des béquilles.

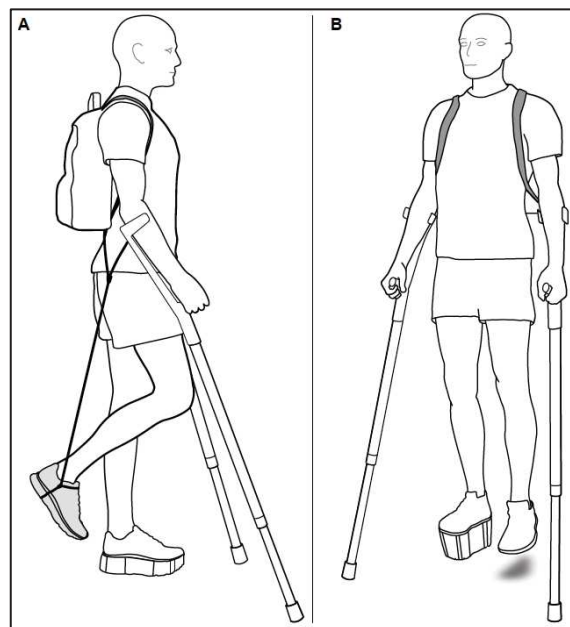


Figure 6 - Modèle expérimental humain de suspension unilatérale du membre inférieur
A : Premier protocole dit « sangle » : le genou du membre inférieur traité est fléchi au moyen d'un harnais d'épaule. B) Second protocole dit « semelle épaisse » : une semelle plus épaisse est portée sur la jambe contrôle, la jambe traitée étant alors suspendue au-dessus du sol. Dans les deux types de protocoles, le participant s'aide au moyen de béquilles. Extrait de Tesch, Lundberg, and Fernandez Gonzalo (2016).

Le fait d'induire un déconditionnement musculaire seulement sur une seule des deux jambes permet également, pour ce modèle expérimental, d'être au plus proche des aspects cliniques rencontrés lors d'une immobilisation à la suite d'une fracture osseuse par exemple. Même si l'on s'éloigne du contexte de l'impesanteur, le modèle ULLS, même s'il n'entraîne pas de transfert des fluides comme les précédents modèles, a été validé pour étudier le déconditionnement musculaire qui se caractérise globalement par une perte de masse musculaire d'environ 0.44% par jour pour le *Vastus Lateralis*, par une diminution de force mais également par l'apparition d'infiltrations graisseuses (Hackney & Ploutz-Snyder, 2012).

Les avantages de ce modèle résident également dans le fait que les sujets qui participent aux études ULLS peuvent continuer à mener la plupart des activités professionnelles sans compromettre l'étude. Contrairement à une expérimentation d'alitement prolongé ou d'immersion sèche, les ressources nécessaires pour mener une étude ULLS sont également nettement inférieures. En effet, outre celles liées à la collecte de données, aucune installation spéciale n'est nécessaire pour les études ULLS.

3. Modèles animaux d'étude des effets de l'hypoactivité

Les rongeurs, principalement la souris et le rat, sont les animaux les plus utilisés dans l'étude du déconditionnement musculaire. Parmi les différents modèles expérimentaux utilisés, les plus pertinents et les plus utilisés restent les modèles de dénervation et de suspension du train arrière (*Hindlimb Unloading* : HU). Le modèle expérimental de dénervation consiste à supprimer, par chirurgie, une partie du nerf sciatique du membre inférieur des rongeurs (Figure 7). Les muscles, de la loge postérieure de la cuisse, de la jambe et du pied, perdent alors leur capacité à se contracter. Cette situation entraîne ainsi un déconditionnement musculaire rapide incluant une forte dégradation protéique (Furuno, Goodman, & Goldberg, 1990). Comme nous le détaillerons dans la partie 2, ce modèle, comme ceux décrits précédemment chez l'homme, entraîne une perte de force disproportionnée à celle de la perte de masse musculaire. Par exemple, l'étude menée par Carlson, Billington, and Faulkner (1996) a montré une perte de masse du muscle extensor digitorum longus (EDL) de 75%, associée à une perte de force maximale isométrique de 99% après 4 mois de dénervation, mesurée avec un système de contractilité *ex vivo*.

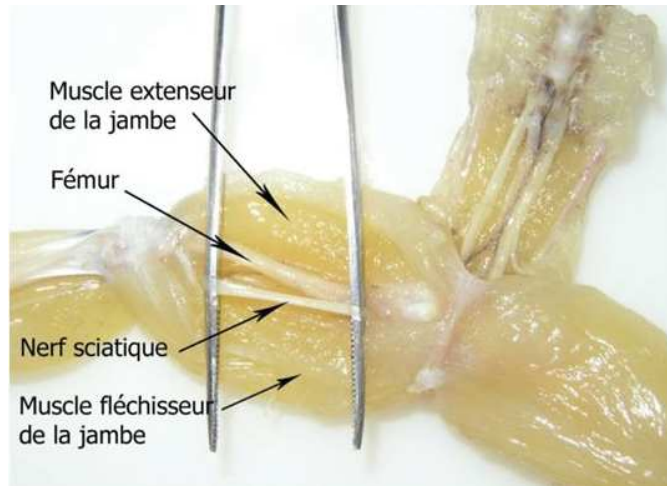


Figure 7 – Schéma anatomique de l'innervation de la partie postérieure du membre inférieur.

Le modèle expérimental de suspension du train arrière (*Hindlimb Unloading*, HU), développé initialement par la NASA (National Aeronautics and Space Administration) dans le milieu des années 1970, a depuis été largement validé comme étant un modèle simulant les effets de l'impesanteur (Baldwin *et al.*, 2013; Morey-Holton & Globus, 2002) (Figure 8). Plusieurs centaines d'articles scientifiques, relatifs à l'utilisation de ce modèle de suspension, ont été publiés (Stevens *et al.*, 2002). Un paramètre crucial de ce modèle réside tout simplement dans la cage et le matériel de suspension en lui-même. En effet, le matériel utilisé doit pouvoir permettre à l'animal de se mouvoir librement dans sa cage tout en ayant les pattes postérieures dans le vide grâce à une suspension assurée par un harnais au niveau du bassin ou une attache à la base de la queue (Brioche *et al.*, 2016; Morey-Holton & Globus, 2002). Des études ayant utilisé une suspension par le bassin ou par la base de la queue ont donné des résultats équivalents (Chowdhury *et al.*, 2013). Par exemple, une perte de masse d'environ 40% du soléaire a été collectivement observée après 14 jours de suspension (Chowdhury *et al.*, 2013; Cros *et al.*, 1999; Mueller, Foley, & Hasser, 2005; Picquet & Falempin, 2003).



Figure 8 – Modèle expérimental de suspension du train arrière chez la souris

4. Modèles cellulaires d'étude du déconditionnement musculaire

Afin d'étudier plus précisément les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans la perte de masse musculaire, de nombreux modèles de culture cellulaire ont été développés. Trois modèles expérimentaux apparaissent comme majeurs dans l'étude de l'atrophie musculaire en culture et seront brièvement présentés : le modèle mimant le jeûne (*starvation en anglais*), le traitement aux glucocorticoïdes (GCs) et l'utilisation de cytokines inflammatoires.

L'un des plus simples, et des plus utilisés, reste tout simplement le fait de priver les cultures de cellules d'un milieu riche en nutriments appelé *starvation* dans la littérature scientifique. De ce fait, en remplaçant le milieu de culture par du PBS (phosphate-buffered saline), l'étude de Sandri *et al.* (2004) a pu mettre en évidence le rôle majeur joué par les facteurs de transcription FoxO dans l'atrophie musculaire. Un simple traitement, au PBS, allant de quelques heures jusqu'à 2 jours, suffit ainsi à entraîner une atrophie rapide des myotubes de différentes lignées (C2C12, L6 ou culture primaire de cellules satellites) (Desgeorges *et al.*, 2014; Stevenson *et al.*, 2005).

Les glucocorticoïdes (GCs) sont également connus comme des médiateurs clés de la protéolyse musculaire (Britto *et al.*, 2014; Schakman *et al.*, 2013) et de nombreuses études ont pu observer des mécanismes similaires entre des modèles de déconditionnement *in vivo* et des expérimentation *in vitro* utilisant de la dexaméthasone (Klaude *et al.*, 2007; Thissen, 2005; Thompson *et al.*, 1999; Tiao *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 1998). Différentes cytokines pro-inflammatoires ont également été utilisées dans différentes études. En effet, lorsqu'il est ajouté au milieu de culture, tumor necrosis factor α (TNF α) est connu pour induire une atrophie musculaire *in vitro* en induisant une augmentation des processus apoptotiques et protéolytiques (Li *et al.*, 1998; Magee, Pearson, & Allen, 2008; Mirza *et al.*, 2014; Moylan *et al.*, 2008). Un cocktail pro-inflammatoire composé de TNF- α et d'interféron γ (INF- γ) a aussi été utilisé dans la littérature pour stimuler l'atrophie musculaire dans des cultures de lignées C2C12 (Dehoux *et al.*, 2007; Kimura *et al.*, 2014).

Partie 2 : Le déconditionnement musculaire

Dès la naissance, le tissu musculaire représente environ 25% du poids corporel, puis ce pourcentage va s'accroître jusqu'à l'âge adulte où il atteindra en moyenne le pourcentage de 40%. Chez les filles et les garçons, la croissance de la masse musculaire est identique jusqu'à la période de puberté, où elle atteint en moyenne une masse de 23kg. Cette augmentation de masse musculaire est corrélée à l'augmentation de la force (Figure 9).

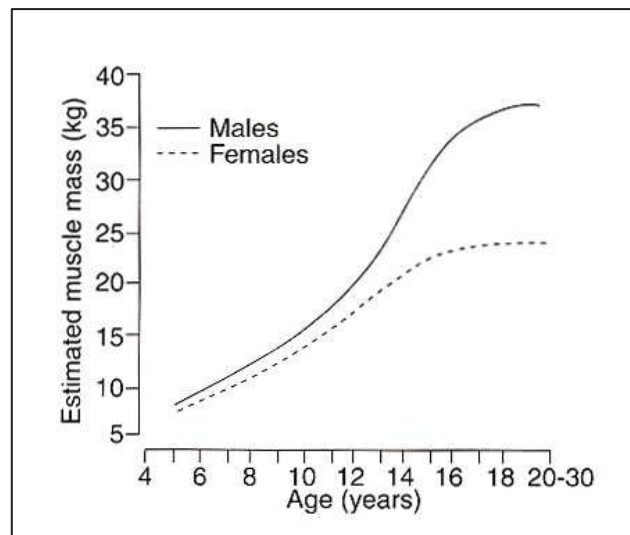


Figure 9 - Évolution de la masse musculaire chez l'homme et la femme (adapté de Malina & Bouchard 1991)

Dès l'âge de 30 ans en moyenne, la masse musculaire tend à décroître, de même que la force mais de manière non corrélée. Entre 40 et 80 ans, le déclin de la masse musculaire opéré par l'avancé en âge est d'environ de 30 à 50% soit de 3 à 8% par décennie, déclin également observé pour la force musculaire (Figure 10).

En parallèle aux processus naturels de croissance et de vieillissement, certains facteurs vont influencer les variations de masse musculaire, en exacerbant les gains ou au contraire les pertes de masse musculaire. Dans le contexte d'une réduction chronique des sollicitations fonctionnelles, lors d'un alitement clinique, lors de l'immobilisation d'une articulation suite à une fracture osseuse, lors d'un séjour en impesanteur ou tout simplement dans le cas de comportements sédentaires, le système musculaire va alors subir un déconditionnement, défini principalement par une perte de masse et de force musculaire, et une fatigabilité accrue.

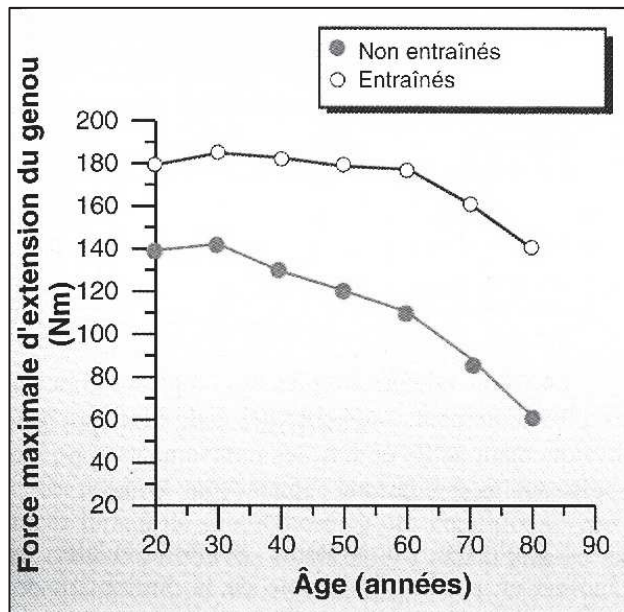


Figure 10 - Évolution de la force musculaire chez des sujets entraînés et non entraînés (Adapté de Willmore & Costill 1994)

Comme nous l'avons décrit en préambule du chapitre 1, il est nécessaire de distinguer le déconditionnement musculaire dit primaire, fortement lié aux conditions de réduction chronique d'activité, du déconditionnement musculaire dit secondaire, conséquence de maladies chroniques.

Dans cette partie 2, nous nous attacherons à décrire et à caractériser le déconditionnement musculaire primaire, principalement à partir des modèles expérimentaux humains, que nous avons décrits en partie 1. Dans ce contexte, la communauté scientifique a largement contribué aux avancées scientifiques et a apporté une multitude d'informations concernant la recherche sur le système musculo-squelettique et les processus de déconditionnement musculaire. Ce dernier se définit de manière générale par, une réduction de la force et de la masse musculaire, et donc de sa surface de section, ainsi que par une fatigabilité accrue (Alkner & Tesch, 2004b; H. E. Berg, Larsson, & Tesch, 1997; Desplanches, 1997; di Prampero & Narici, 2003; Manini *et al.*, 2007).

1. Le déconditionnement musculaire : une perte de masse et de force musculaire.

De nombreuses études ont démontré que le syndrome moteur de l'impesanteur est caractérisé entre autre par une diminution du tonus musculaire, des changements dans la structure musculaire caractérisés par une atrophie, une altération des myofibrilles et de la composition

en fibres musculaires (myotypologie), et une réduction importante de la force de contraction. Ces changements sont de plus grande amplitude dans les muscles posturaux (Adams, Caiozzo, & Baldwin, 2003; Berry, Berry, & Manelfe, 1993; Williams *et al.*, 2009). Les mécanismes physiologiques impliqués dans l'adaptation de la tonicité des muscles posturaux à l'impesanteur sont résumés dans la figure ci-dessous (Figure 11). Les changements et modifications au niveau neuro-moteur ont également pour conséquences des perturbations dans la coordination, ce qui entraîne une diminution de la précision des mouvements, de la performance dans les différentes tâches motrices, une diminution de la stabilité posturale et des troubles de la locomotion (Gazenko, Grigoriev, & Kozlovskaya, 1987; Kozlovskaya *et al.*, 1981).

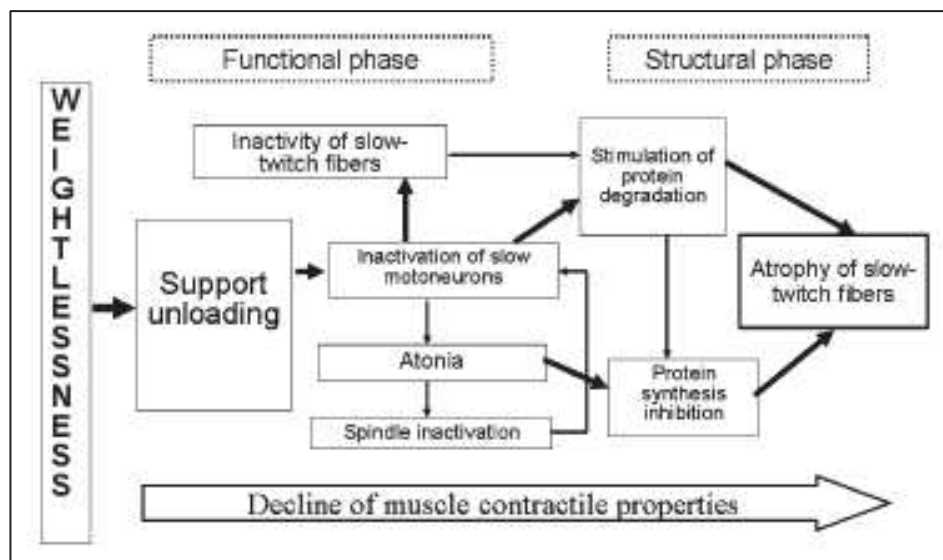


Figure 11 - Diagramme représentant les mécanismes physiologiques de l'adaptation des muscles à l'impesanteur (Kozlovskaya, 2007)

Plusieurs paramètres permettent de préciser la définition du déconditionnement musculaire, en particulier, la nature des muscles les plus sensibles à la réduction chronique d'activité que sont les muscles posturaux, la cinétique de perte de masse musculaire précoce et non linéaire, et enfin le fait que le degré de perte de force et de masse musculaire ne sont pas corrélés.

La plupart des études concernant le déconditionnement musculaire se caractérisent par des protocoles de moyenne et longue durée. Toutefois, les études permettant d'évaluer une cinétique du processus de déconditionnement musculaire permettent clairement de souligner que la plus grande perte de masse musculaire s'opère dans les premiers jours d'une situation

d'hypoactivité, se caractérisant par une diminution très rapide dans les premiers jours, processus qui tend à se stabiliser par la suite (Akima *et al.*, 1997; Cros *et al.*, 1999; Edgerton *et al.*, 1995; Hanson *et al.*, 2013; Kawashima *et al.*, 2004) (Figure 12). En effet, l'étude de Kawashima *et al.* (2004) a observé une baisse significative d'environ 5% de la surface de section (CSA) de plusieurs groupes musculaires dès 10 jours de bed rest. Chez l'homme toujours, dès les premières semaines d'alitement prolongé ou de suspension unilatérale de la jambe, il est aussi observé une atrophie significative des muscles du dos et de la jambe (H. E.; Berg *et al.*, 1991; A. D. LeBlanc *et al.*, 1992).

Par ailleurs, des études utilisant des modèles animaux ont également pu déterminer l'impact des différents modèles de déconditionnement musculaire sur de très courtes périodes. L'étude de Cros *et al.* (1999) a par exemple montré que seulement 2 jours de Hindlimb Unloading (HU) chez le rat diminuaient de 20% la masse du soléaire et cette étude illustre bien le caractère non linéaire du déconditionnement musculaire (Figure 12). Chez la souris, moins sensible aux altérations provoquées par le HU, 7 jours de suspension ont aussi engendré une diminution de la CSA des fibres de type I et IIa du Soleus (Hanson *et al.*, 2013). Enfin, chez le lapin, une diminution de la CSA de 17% a été observée après 6 jours d'immobilisation de la cheville (H. K. Smith *et al.*, 2000). Ainsi ces nombreuses études menées chez l'homme ou chez l'animal ont souligné que la perte de masse musculaire engendrée par des situations de déconditionnement musculaire, liées à l'hypoactivité, était très précoce et apparaissait dès les premiers jours.

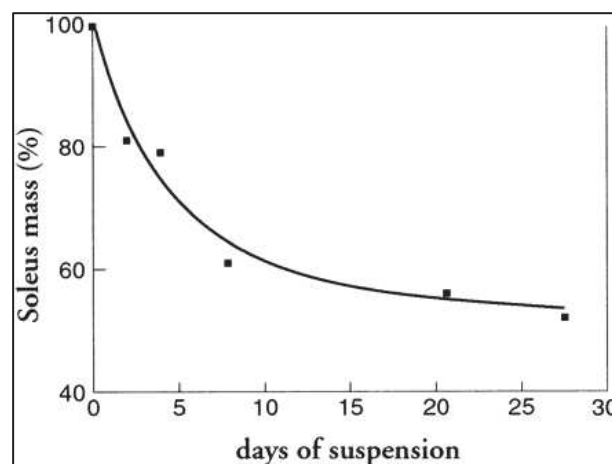


Figure 12 – Diminution de la masse du soleus (modèle rat) lors d'une réduction chronique d'activité (modèle de suspension du train arrière) (Cros *et al.*, 1999)

1.1. Paramètres de force, raideur, couple force-vitesse

Concernant la sensibilité des muscles posturaux, il a été rapporté une diminution du couple force-vitesse des muscles posturaux des jambes de 30% à 40% après 7 jours d'immersion sèche (Grigor'ev *et al.*, 2004; Kozlovskaya, 2002), et l'endurance de ces muscles a également diminué (Kozlovskaya, 2002). Dès 24 heures d'immersion, les auteurs rapportent une diminution d'environ 30% de la raideur du muscle soleus (Figure 13) (Grigor'ev *et al.*, 2004; Grigor'eva & Kozlovskaya, 1983; Kozlovskaya, 2002; Miller *et al.*, 2004; Vinogradova *et al.*, 2002).

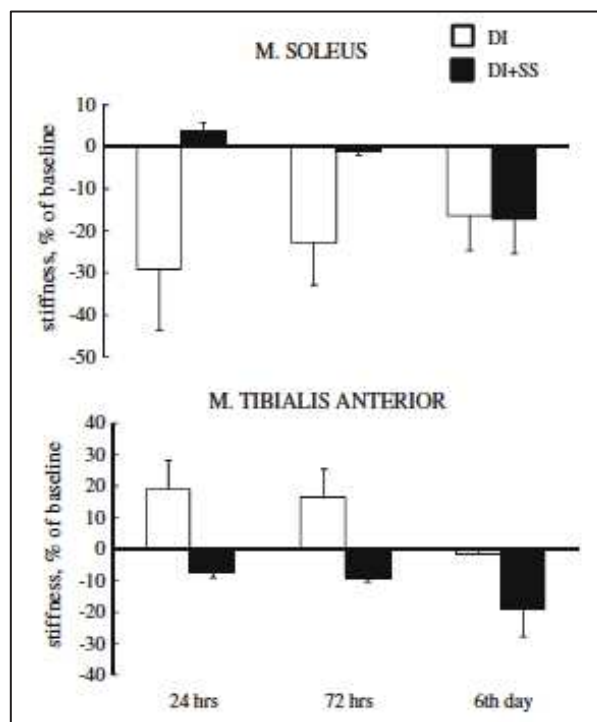


Figure 13 – Pourcentage d'évolution de la raideur musculaire dans le Tibialis Anterior après 1 jour, 3 jours et 6 jours d'immersion sèche (Kozlovskaya, 2007)

L'intensité et le degré des changements neuromusculaires qui se produisent lors d'une expérimentation d'immersion sèche sont beaucoup plus importants que ceux qui surviennent lors d'un alitement prolongé. Une diminution de la raideur musculaire est par exemple observée immédiatement avec le modèle d'immersion sèche (diminution de 40-50% après seulement 6 heures), alors qu'avec le modèle d'alitement prolongé, la diminution de raideur musculaire ne peut être détectée qu'après 3-4 jours et atteint une diminution de 30 à 40% après 14 à 30 jours d'alitement (Kozlovskaya, 2002; Kozlovskaya & Kirenskaya, 1987).

Les études utilisant le modèle ULLS ont révélé que la force maximale volontaire de l'extension du genou avait diminué de 12 à 17% après 10 à 21 jours de réduction d'activité (Adams, Hather, & Dudley, 1994; H. E. Berg & Tesch, 1996; Gamrin *et al.*, 1998; Schulze, Gallagher, & Trappe, 2002). Des études beaucoup plus longues de 28, 35 et 42 jours, avec ce même modèle, ont rapporté que cette force maximale volontaire de l'extension du genou avait diminué de 20% (H. E.; Berg *et al.*, 1991; Dudley *et al.*, 1992; Ploutz-Snyder *et al.*, 1995; Ploutz-Snyder *et al.*, 1996). En plus de l'analyse des données de la cuisse, une étude a également rapporté que la force maximale volontaire du triceps sural a diminué de 17% après 21 jours d'ULLS (Schulze *et al.*, 2002). Les changements de force observés avec le modèle ULLS semblent être parallèles à ceux rapportés à la fois par le vol spatial et l'alitement prolongé (Figure 14).

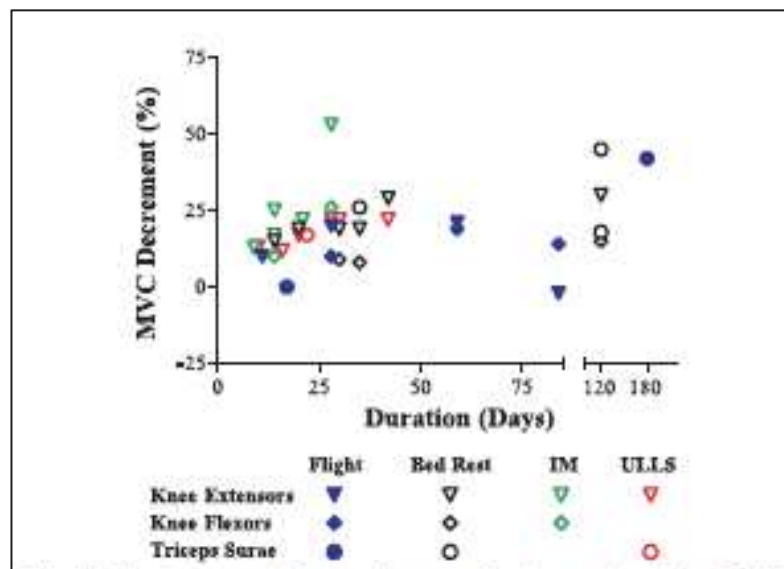


Figure 14 – Evaluation de la force maximale volontaire (MVC) : comparaisons des résultats dans différentes études (vol spatial, bed rest, immobilisation (IM), et suspension unilatérale (ULLS) de la jambe (Baldwin *et al.*, 2013)

1.2. Evaluation des sections transversales des groupes musculaires, des muscles, et des fibres musculaires

L'imagerie par résonance magnétique (IRM) a été utilisée dans plusieurs études humaines afin d'évaluer les changements de surface de section des différents muscles de la cuisse et de la jambe principalement, mais également pour évaluer les changements de masse grasse. Concernant les études menées à l'aide du modèle expérimental ULLS, après 16 jours

d'hypoactivité du membre inférieur, le muscle quadriceps subit une réduction de sa surface de section de 8% (Adams *et al.*, 1994). Des études de plus longues durées (21j, 28j, 35j et 42 jours) avec le même modèle rapportent une diminution de CSA de 7% (21j et 28j), de 14% (35 jours) et 16% (42 jours) en moyenne (H. E.; Berg *et al.*, 1991; Dudley *et al.*, 1992; Hather *et al.*, 1992; Ploutz-Snyder *et al.*, 1995; Ploutz-Snyder *et al.*, 1996; Schulze *et al.*, 2002). Dans l'étude de Hather *et al.* de 42 jours, il est démontré de manière classique, une plus grande sensibilité du soléaire, muscle postural, pour lequel les auteurs rapportent une atrophie de 25% comparée à celle des muscles gastrocnémiens de 17 % (Hather *et al.*, 1992). L'étude de LeBlanc *et al.* (1992) rapporte que les muscles de la jambe subissent une atrophie de 30% après 120 jours d'alitement prolongé (A. D. LeBlanc *et al.*, 1992). Ces amplitudes de changements associées au modèle ULLS ou bed rest sont semblables à celles rapportées pour les vols spatiaux (Figure 15). Il faut toutefois rester prudent sur les comparaisons entre vols spatiaux et modèles expérimentaux puisque dans le cas des vols spatiaux, l'effet de l'exercice physique des astronautes ne peut être séparé (Hather *et al.*, 1992; A. LeBlanc *et al.*, 2000).

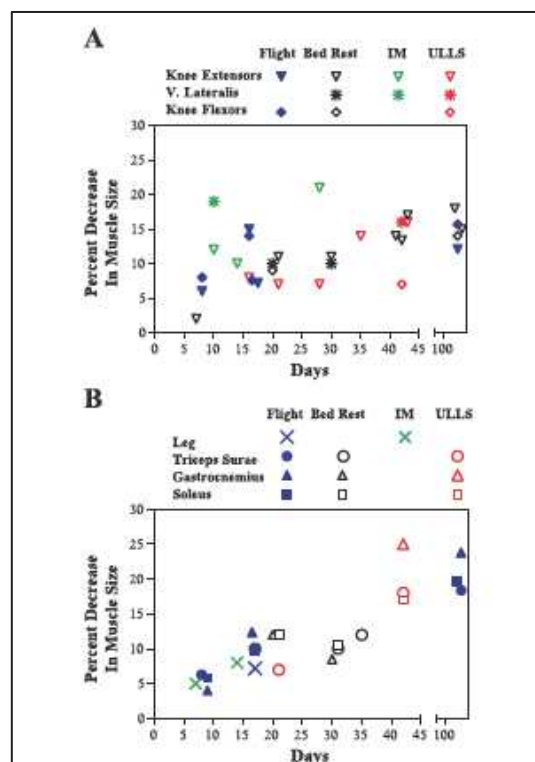


Figure 15 - Evaluations des sections transversales des groupes musculaires et des muscles : comparaisons des résultats dans différentes études (vol spatial, bed rest, immobilisation (IM), et suspension unilatérale (ULLS) de la jambe (Baldwin *et al.*, 2013)

Dans les études utilisant le modèle de bed rest, il est rapporté des changements du volume musculaire du quadriceps de 3% dès 7 jours d'hypoactivité (Ferrando *et al.*, 1995), et de 10% à la suite de 20 jours (Kubo *et al.*, 2000). L'étude de Alkner et Tesch rapporte une diminution du volume de quadriceps et triceps sural de 10 et 16% respectivement après 29 jours de bed rest (Alkner & Tesch, 2004a). Des études plus longues ont rapporté une diminution de 14% du volume du quadriceps lors de 56 jours de bedrest et une diminution de 18% après 90 jours de bedrest (Akima *et al.*, 1997; Mulder *et al.*, 2006; Thom *et al.*, 2001). Chez les astronautes, une réduction de 15 et 10% du volume musculaire du soleus et gastrocnemius respectivement a été observée à la suite de 6 mois de microgravité à bord de l'ISS (Trappe *et al.*, 2009).

Au niveau cellulaire, Widrick et al. (2002) ont rapporté que 12 jours de ULLS induisait une diminution de 7% de la section transversale (CSA) moyenne des fibres du soleus, tandis que celle des fibres du gastrocnemius reste inchangée (Widrick *et al.*, 2002). Après 42 jours de ULLS, la CSA des fibres musculaires du Vastus Lateralis a diminué respectivement de 12 et 15% pour les fibres de type I et de type II (Ferretti *et al.*, 2001). La Figure 16 renseigne sur les résultats obtenus à l'aide de différents modèles expérimentaux et lors de vols spatiaux.

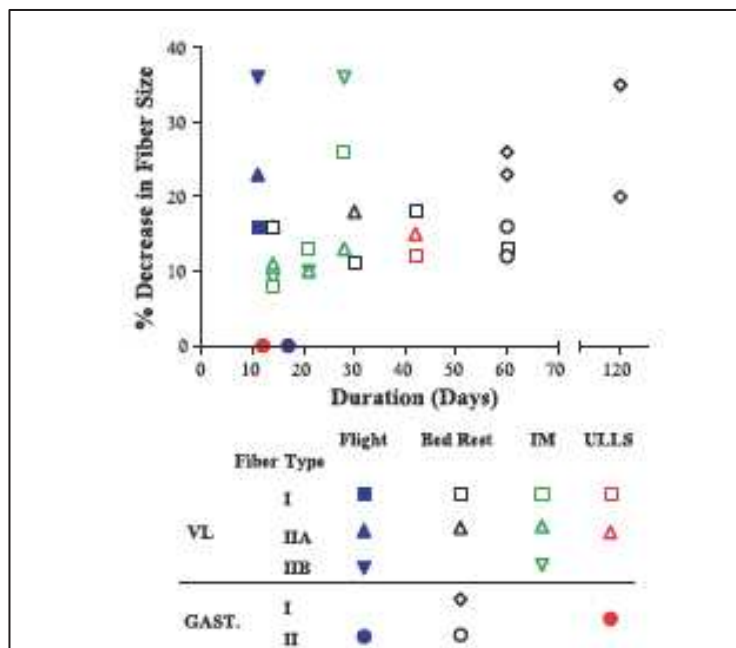


Figure 16 – Evaluation des sections transversales des fibres musculaires : comparaisons des résultats dans différentes études (vol spatial, bed rest, immobilisation (IM), et suspension unilatérale (ULLS) de la jambe (Baldwin *et al.*, 2013)

Dans des expérimentations de courte durée, à l'aide du modèle dry immersion, une atrophie significative est rapportée pour les fibres de type I du muscle soleus (Litvinova *et al.*, 2004; Moukhina *et al.*, 2004; Nemirovskaya & Shenkman, 2002; Shenkman *et al.*, 1997). Cette atrophie précoce est associée à une diminution d'environ 30% du niveau d'expression des protéines sarcomériques, comme la titine et la nébuline (Grigor'ev *et al.*, 2004; Shenkman, Litvinova, *et al.*, 2004; Shenkman, Podlubnaia, *et al.*, 2004). Une diminution de la CSA des fibres de type I (-16%) et des fibres de type II (-36%) du muscle Vastus Lateralis a été observée à la suite de 11 jours de vol spatial (Edgerton *et al.*, 1995).

En parallèle aux diminutions de CSA des muscles et des fibres musculaires, les résultats rapportés pour les réductions de force musculaire sont de plus grande amplitude. En effet, alors que la section transversale d'un muscle est globalement proportionnelle à la force produite lors de la croissance musculaire, ces paramètres ne sont pas corrélés lors d'un processus de déconditionnement musculaire. Une diminution de force accrue par rapport au degré d'atrophie a ainsi été rapportée dans différentes expérimentations. Une étude de bed rest de 20 jours a souligné une diminution de la force statique maximale pour les fléchisseurs et extenseurs du genou (de -18,9% et -26,8%), diminution plus importante que celle de la CSA de la cuisse (environ -7%) (Akima *et al.*, 2000; Akima *et al.*, 1997; Akima *et al.*, 2003). A la suite de 6 semaines d'alitement, Berg et collaborateurs ont rapporté une diminution de CSA du quadriceps de 14% alors que les forces isométrique et concentrique d'extension du genou ont été réduite de 25% et 30% (H. E. Berg *et al.*, 1997). Durant une hypoactivité de longue durée (90 jours de bed rest), l'étude de Alkner et Tesch souligne une atrophie du quadriceps et du triceps sural, respectivement de 18% et 29%, et une diminution de force de 31% et 37% respectivement (Alkner & Tesch, 2004b).

La réduction de la force musculaire s'explique en grande partie par la réduction de la section transversale des muscles et des fibres. D'autres facteurs se surajoutent pour expliquer les plus grandes pertes de force que de diminution de section transversale. La figure ci-dessous illustre bien ces diminutions disproportionnelles (Figure 17). Parmi ces facteurs, le déficit d'activité neuronale ou la diminution de la tension spécifique des fibres représenteraient un certain pourcentage (di Prampero & Narici, 2003; Ferretti *et al.*, 2001). D'autre part, l'accumulation accrue des infiltrations graisseuses liée à l'hypoactivité pourrait également contribuer à ce processus disproportionnel.

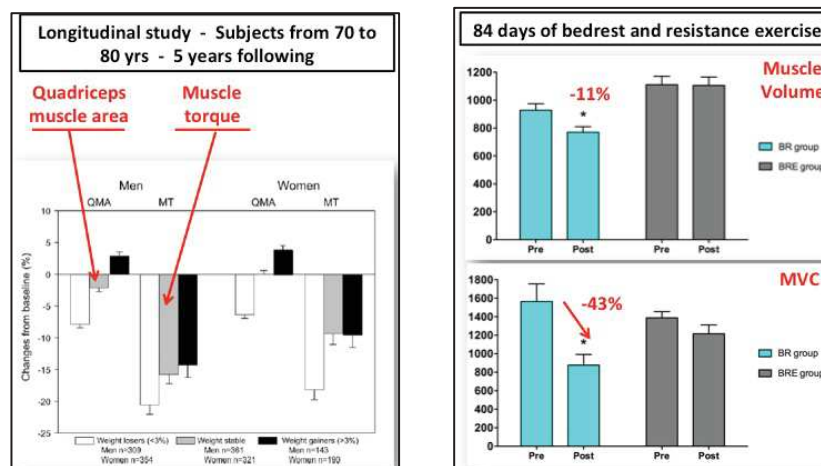


Figure 17 – Diminution disproportionnelle de force et de section transversale des muscles lors du vieillissement (Matthew J Delmonico, Harris, Visser, Park, Conroy, Velasquez-Mieyer, Boudreau, Manini, Nevitt, Newman, & Goodpaster, 2009) et suite à une expérimentation de bed rest de 3 mois (Trappe *et al.*, 2004)

Cet état de la littérature souligne clairement que le déconditionnement musculaire se définit en grande partie par une perte de force d'amplitude plus importante que la perte de masse musculaire. Les paragraphes suivant exposent des paramètres supplémentaires liés au déconditionnement, que sont les changements myotypologiques et l'accumulation des infiltrations graisseuses (M. Iwase, Kimura, *et al.*). Ces paramètres apparaissent ainsi comme des facteurs supplémentaires du déconditionnement et contribuant à expliquer la disproportion entre la perte de masse et de force musculaire.

1.3. Hypoactivité et changements myotypologiques

Concernant le processus de changement myotypologique (ou shift phénotypique), on distingue au sein d'un même muscle des fibres lentes, riches en chaînes lourdes de myosine (MyHC) de type I, qui développent des forces plus faibles que des fibres rapides riches en MyHC de type II. Il existe aussi plusieurs isoformes de myosines de type II que l'on distingue en fonction de leur vitesse de contraction, par ordre croissant : IIa, IIx et IIb chez le rongeur, l'isoforme IIb n'étant pas exprimée chez l'homme (Egan & Zierath, 2013; Stevens *et al.*, 2004).

Il est clairement décrit et expliqué dans la littérature que les muscles les plus touchés par le déconditionnement musculaire lié à l'hypoactivité sont les muscles posturaux, composés majoritairement de fibres de type I, dites oxydatives (Baldwin *et al.*, 2013). Dans des

conditions d'inactivité musculaire, les muscles vont perdre leurs fonctions spécifiques de maintien postural, associé principalement au métabolisme oxydatif. L'étude de Baldwin *et al.* (1990) en rapport à un vol spatial de 12 jours chez le rat démontre que les myosines de type I représentent l'isoforme la plus régulée et donc la moins exprimée. Hormis dans quelques cas comme celui de la sarcopénie pour lequel le shift phénotypique est inversé (Brioche *et al.*, 2016), les différentes situations de déconditionnement musculaire résultent généralement d'une diminution de la quantité en myosines de type I au détriment des myosines de type II (Baldwin *et al.*, 2013). Ce shift phénotypique, en plus d'être conditionné par une situation globale d'atrophie musculaire, a pour conséquence d'induire une fatigabilité accrue du muscle concerné. En effet, les MyHC de type II ont un régime de contraction plus rapide mais sont d'avantage fatigables en comparaison aux MyHC de type I.

Les premières biopsies musculaires recueillies afin d'étudier la microgravité réelle ont été obtenues à partir du muscle *vastus lateralis* d'astronautes, avant et après des vols spatiaux de 5 et 11 jours (Zhou *et al.*, 1995). Dans cette étude, les résultats soulignent de grandes différences inter-individuelles et indiquent changement de typologie rapide, se traduisant par une diminution des fibres exprimant des myosines lentes et une augmentation du nombre de fibre exprimant des myosines de types rapides (Zhou *et al.*, 1995). L'étude d'Edgerton *et al.* (1995) a également reporté une sensibilité accrue des fibres musculaires à la fatigue après une exposition à la microgravité (Edgerton *et al.*, 1995). Dans l'ensemble, ces résultats obtenus à partir de biopsies musculaires humaines indiquent que les adaptations des fibres concernant les propriétés métaboliques, leurs tailles et leur vascularisation se produisent rapidement dans un contexte de microgravité et que ces adaptations sont semblables aux études menées sur des rongeurs après avoir subi une simulation de la microgravité réelle ou une suspension de membres postérieurs par le biais de modèle de microgravité simulée (modèle HU) (Fitts *et al.*, 2013; Fitts *et al.*, 2010; Tagliaferri *et al.*, 2015; Vernikos & Schneider, 2010).

Pour des missions plus longues, d'environ 6 mois, sur la Station Spatiale Internationale, Fitts *et al.* (2010) ont documenté des pertes majeures de masse, de force et de puissance de fibres dans l'ordre suivant: Soleus Type I - Soleus Type II - Gastrocnemius Type I - Gastrocnemius type II (Fitts *et al.*, 2010). Ces transformations de types de fibres associées au vol spatial ont été confirmées dans des études d'alitement prolongé (bed rest) de courte et longue durée

(Borina *et al.*, 2010; Krainski *et al.*, 2014; Rudnick *et al.*, 2004; Tagliaferri *et al.*, 2015; Trappe *et al.*, 2004).

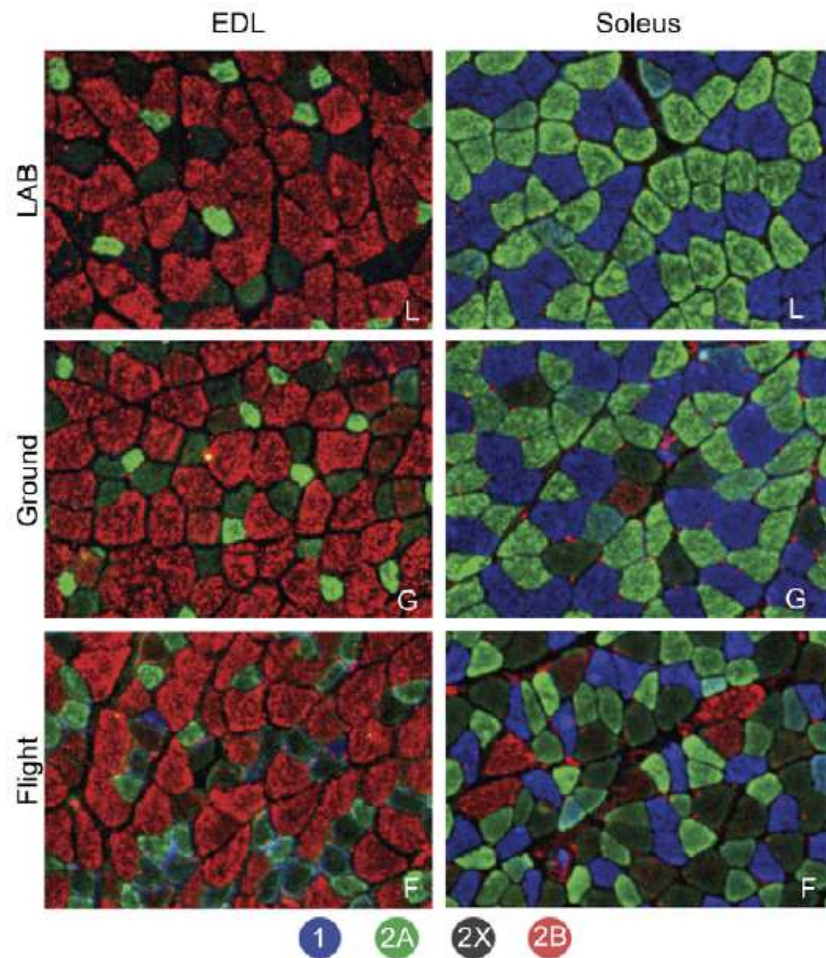


Figure 18 - Impact de la microgravité sur la myotypologie chez l'animal (Sandona *et al.*, 2012).

On remarque clairement sur la figure 18F, le degré d'atrophie des fibres musculaires ainsi que les changements myotypologiques

Hespel *et al.* ont rapporté que 14 jours d'immobilisation chez l'homme avaient entraîné des diminutions d'aire de sections de fibres musculaires de 8% pour les fibres de type I, 11% pour les fibres de types IIa et enfin 9% pour IIb. Ceci indique que les changements de l'aire de section des myofibres peuvent être identifiés à partir de cinétique assez courte (Hespel *et al.*, 2001). Après 21 jours d'immobilisation, la CSA des myofibres du Vastus Lateralis a été diminuée de 13% dans les fibres de type I et de 10% dans les fibres de types IIa et IIx (Hortobagyi *et al.*, 2000). Dans l'étude de 28 jours, Veldhuizen *et al.* ont constaté que les diminutions de l'aire de section des fibres musculaires du VL étaient les suivantes: type I, 26%; IIa, 13%; et IIb (x), 36%. (Veldhuizen *et al.*, 1993). Ceci représente des indicateurs

d'évolution d'aire de section de fibre musculaire qui ont été identifiés dans la littérature pour des sujets en bonne santé. Néanmoins, Blakemore et al. ont démontré qu'après 6 semaines d'immobilisation concernant une fracture tibiale, les aires de section des fibres de type I et II ont diminué respectivement de 29 et 36%. (Blakemore *et al.*, 1996).

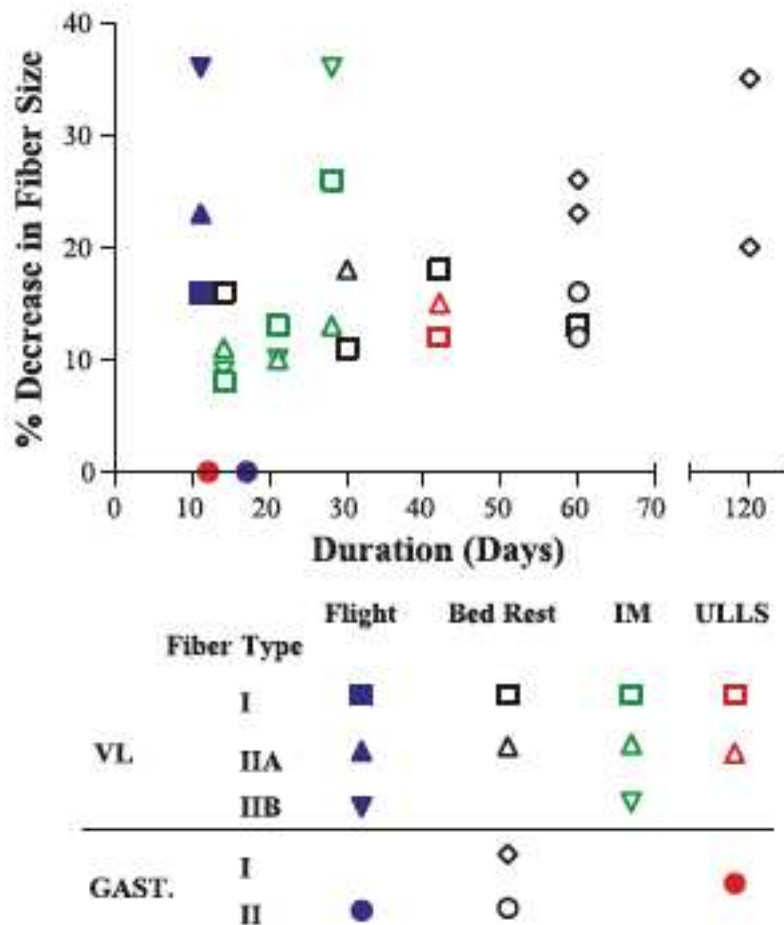


Figure 19- Pourcentage d'atrophie des fibres musculaires (par type) après des expérimentations de vol spatial, d'alitement prolongé, d'immobilisation et d'ULLS (Adams *et al.*, 2003).

2. Le déconditionnement musculaire et l'accumulations d'infiltrations graisseuses

2.1. Définition et localisation des infiltrations graisseuses ou IMAT et leurs

localisations

Dénommées IMAT pour « Inter-Muscular Adipose Tissue », les adipocytes associés aux infiltrations graisseuses sont localisés sous l'épimysium du muscle, entre les fibres et/ou les

faisceaux de fibres musculaires. Ils sont identifiés par l'intermédiaire de leur accumulation à l'extérieur de la cellule musculaire (Figure 20). Il est important de différencier les IMAT et les gouttelettes lipidiques se trouvant au sein de la cellule musculaire représentant de réels réservoirs d'énergie (Addison *et al.*, 2014; Karampinos *et al.*, 2012; Vettor *et al.*, 2009).

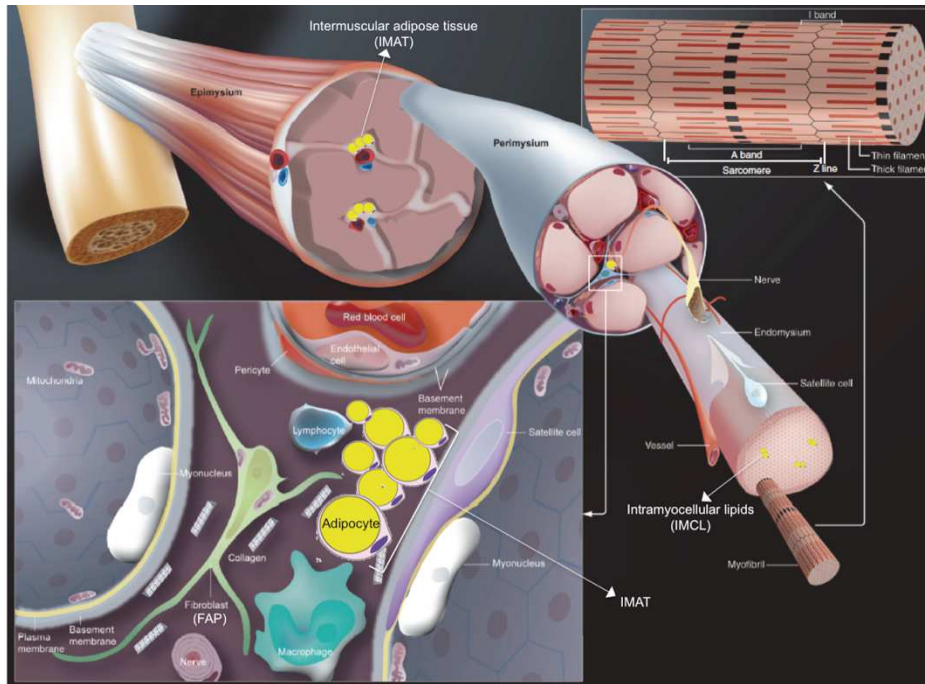


Figure 20 - Illustration de la localisation des IMAT au sein de l'environnement musculaire

Ce schéma représente la structure du tissu musculaire et la localisation spécifique des IMAT. Les IMAT sont constitués d'adipocytes localisés sous l'épimysium du muscle, entre les faisceaux de fibres, et sous le périmysium entre les fibres. La localisation des gouttelettes lipidiques intramyocellulaires (IMCL) est également représentée.

2.2. IMAT et fonction musculaire

L'évaluation du degré d'infiltrations graisseuses ou IMAT au sein du tissu musculaire, chez l'Homme, est possible avec des outils tels que l'IRM ou encore les techniques tomodynamiques. En revanche, chez l'animal, cette problématique est très difficile à explorer puisque le tissu musculaire de rongeurs est dépourvu d'infiltrations graisseuses. De fait, les modèles expérimentaux utilisés afin d'induire cette adiposité ectopique sont souvent couplés à la régénération musculaire. Ces mécanismes spécifiques peuvent ainsi être abordés par l'étude de l'augmentation du contenu en IMAT avec l'avancée en âge.

L'augmentation des IMAT a été associée à une altération fonctionnelle du muscle et notamment une diminution de force. L'étude de di Prampero et Narici en 2003, met en valeur, une diminution de la force maximale développée de 25% à la suite de vols spatiaux. Cette perte de force, comme nous l'avons décrit plus haut est beaucoup plus importante que le niveau de perte de masse musculaire, suggérant que d'autres facteurs influencent grandement cette perte de force (di Prampero and Narici (2003)). De même, l'étude de Delmonico et al, a démontré une diminution de force 2 à 5 fois supérieure à celle de la masse musculaire dans un contexte d'avancée en âge, vraisemblablement due à l'importance des accumulations graisseuses (Delmonico *et al.*, 2009).

Alors que la littérature met en avant que la perte de force musculaire est beaucoup plus importante que la perte de masse musculaire dans un contexte induisant le déconditionnement musculaire (H. E. Berg *et al.*, 1997; M. J. Delmonico, Harris, Visser, Park, Conroy, Velasquez-Mieyer, Boudreau, Manini, Nevitt, Newman, Goodpaster, *et al.*, 2009; di Prampero & Narici, 2003; Jubrias *et al.*, 1997), l'aspect de l'apparition d'infiltrations graisseuses entre les fibres musculaires (IMAT pour « Inter-Muscular Adipose Tissue ») est un facteur qui pourrait influencer et expliquer cette perte de force musculaire.

Le développement et l'apparition d'IMAT est quelque chose de peu étudié mais apparaît comme un facteur caractéristique du déconditionnement musculaire au même titre que l'apparition de fibres dite rapides (Addison *et al.*, 2014; Brioché *et al.*, 2016). L'accumulation d'IMAT est fortement corrélée aux différentes situations de déconditionnement musculaire (Marcus *et al.*, 2010; Sciorati *et al.*, 2015; Uezumi, Ikemoto-Uezumi, & Tsuchida, 2014).

2.3. IMAT et déconditionnement musculaire

Les études de plus en plus nombreuses concernant les infiltrations graisseuses indiquent de façon plus précise leurs rôles prépondérants et leurs véritables impacts sur la fonction musculaire. Bien qu'aléatoirement présent et quantitativement variable en fonction de chaque individu, le développement et l'accumulation des IMAT reste liés au déconditionnement musculaire. Plus particulièrement des contextes bien spécifiques sont ainsi répertoriés : la sarcopénie (Addison *et al.*, 2014; Brioché *et al.*, 2016; Kirkland *et al.*, 2002), l'inactivité (Manini *et al.*, 2007), l'obésité et le diabète de type II (Gallagher *et al.*, 2014; Goodpaster *et*

al., 1999; Karampinos *et al.*, 2012), lors de dénervation (Ceylan *et al.*, 2014; Dolor *et al.*, 1998), la rupture tendineuse (Farshad *et al.*, 2011; Kuzel *et al.*, 2013).

Il a surtout été démontré de nombreuses corrélations entre l'accumulation d'IMAT et la perte de masse musculaire, de force et d'insulino-sensibilité (M. J. Delmonico, Harris, Visser, Park, Conroy, Velasquez-Mieyer, Boudreau, Manini, Nevitt, Newman, Goodpaster, *et al.*, 2009; Goodpaster, Thaete, & Kelley, 2000a; Miljkovic-Gacic *et al.*, 2008; Visser *et al.*, 2005) Figure 21.

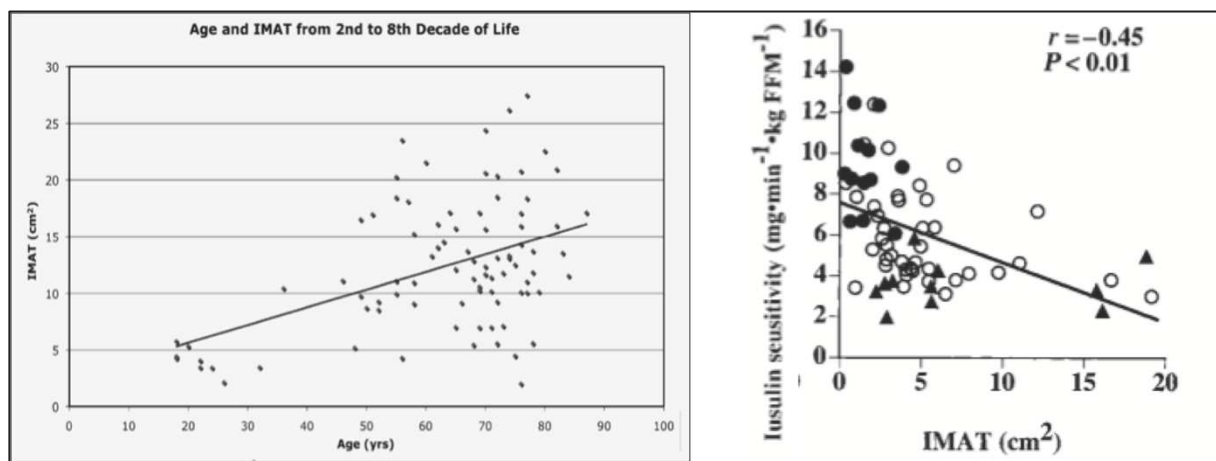


Figure 21 - Corrélations entre contenu en IMAT et avancée en âge/sensibilité à l'insuline

Le graphique de gauche rapporte la relation de corrélation entre l'avancée en âge et le développement d'IMAT. Le deuxième graphique souligne la corrélation négative entre le contenu en IMAT et la sensibilité à l'insuline. Adapté de Marcus *et al.* (2010) et Goodpaster, Thaete, and Kelley (2000b).

Deux études ont permis de mettre en évidence une corrélation entre l'accumulation d'IMAT et la perte de masse mais aussi la perte de force musculaire (Goodpaster *et al.*, 2001; Visser *et al.*, 2002). L'étude de Visser *et al.* (2002) a permis de mettre en avant une diminution de la performance aux tests de marche de 6 mètres et levers de chaise enchaînés. Ceci est également associé à une corrélation entre les niveaux d'accumulation d'IMAT et les performances aux deux tests. Dans le contexte spécifique de la sarcopénie, d'autres études ont montré que l'accumulation d'IMAT représentait un risque indépendant de la réduction de mobilité (Beavers *et al.*, 2013; Marcus *et al.*, 2012; R. A. Murphy *et al.*, 2014; Tuttle, Sinacore, & Mueller, 2012; Visser *et al.*, 2005) .

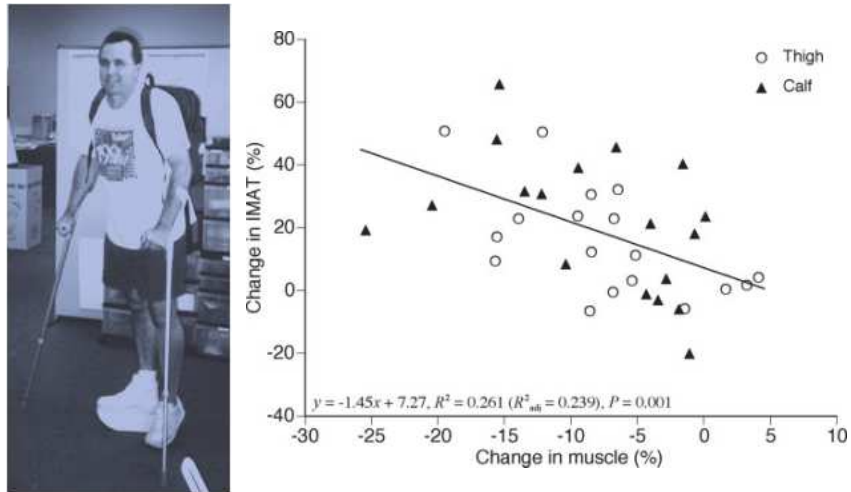


Figure 22 - Corrélation entre le degré d'atrophie des fibres musculaires et l'accumulation d'infiltrations graisseuses dans une expérimentation d'hypoactivité (Manini *et al.*, 2007)

Bien que les mécanismes moléculaires et cellulaires menant à l'accumulation d'IMAT soient encore méconnus, ceux décrivant la perte de masse musculaire sont quant eux bien détaillés. Ainsi de nombreux modèles expérimentaux ont pu démontrer et décrire les interactions majeures entre les différents systèmes protéolytiques et de protéosynthèse pouvant agir sur la perte de la masse musculaire.

3. Altération de la jonction neuromusculaire lors du déconditionnement musculaire

Un ensemble de protéines est fortement régulé en fonction de différentes conditions conduisant à un déconditionnement musculaire et aboutissant à une atrophie musculaire. Ces protéines appelés «atrogènes», entre autres Atrogin-1 et MuRF1, sont des ubiquitines ligases E3 caractérisées comme régulateurs clés de la dégradation protéique des troubles musculaires (Lecker *et al.*, 2004). La dysfonction au niveau de la jonction neuromusculaire participe à la perte de fonctionnalité lié au vieillissement (sarcopénie). L'exercice et la restriction calorique peuvent avoir des effets réversibles sur le déconditionnement (Deschenes *et al.*, 2015; Fahim, 1997; Hepple & Rice, 2016; Rudolf *et al.*, 2014; Valdez *et al.*, 2010). Alors que MuRF1 est considéré comme une protéine centrale responsable de la dégradation des protéines sarcomériques lors du déconditionnement musculaire, il a récemment été constaté qu'il était clairement lié à la jonction neuromusculaire. De plus, il a été démontré que MuRF1 était impliqué dans la dégradation d'un composant majeur de la jonction neuromusculaire (le récepteur acétylcholine nicotinique (AChR)), induite par un déconditionnement musculaire (Khan *et al.*, 2014; Rudolf *et al.*, 2013).

L'augmentation du renouvellement de l'AChR, la fragmentation des jonctions neuromusculaires et la dysfonction synaptique précoce, y compris une dénervation partielle, ont été observés chez des souris atteintes d'une perte spécifique de Atg7 (Carnio *et al.*, 2014). En conséquence, l'autophagie est dérégulée dans le muscle squelettique des chiens âgés (Pagano *et al.*, 2015) et chez l'humain (Carnio *et al.*, 2014). Néanmoins il a été démontré que la restriction calorique et l'exercice physique sont bénéfiques pour le maintien et la stabilisation de la jonction neuromusculaire (Tintignac, Brenner, & Ruegg, 2015; Valdez *et al.*, 2010) et l'état d'innervation (Piasecki *et al.*, 2016; Tintignac *et al.*, 2015) et, en même temps, réduisent l'altération de l'autophagie (Carnio *et al.*, 2014) ainsi que l'apparition de la sarcopénie ou sa progression (Bowen, Schuler, & Adams, 2015; Phu, Boersma, & Duque, 2015; van Norren *et al.*, 2015). Cela suggère que la modulation de l'autophagie est une cible thérapeutique potentielle dans les troubles de la transmission neuromusculaire (Figure 23).

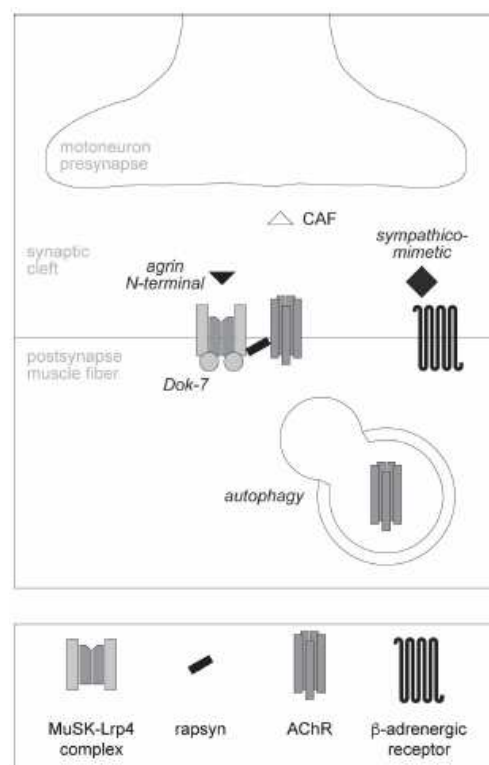


Figure 23 - Voies majeures impliquées dans la maintenance de la jonction neuromusculaire (Rudolf, Deschenes, & Sandri, 2016)

Alors que l'autophagie et d'autres processus sont essentiels à la dégradation des composants de la jonction neuromusculaire, l'axe de signalisation agrin-MuSK-Lrp4 sert de lien entre le nerf et le muscle (Tintignac *et al.*, 2015) (Figure 23). En effet, l'agrine neuronale est libérée par le neurone moteur dans la fente synaptique où elle se lie au co-récepteur Lrp4 pour

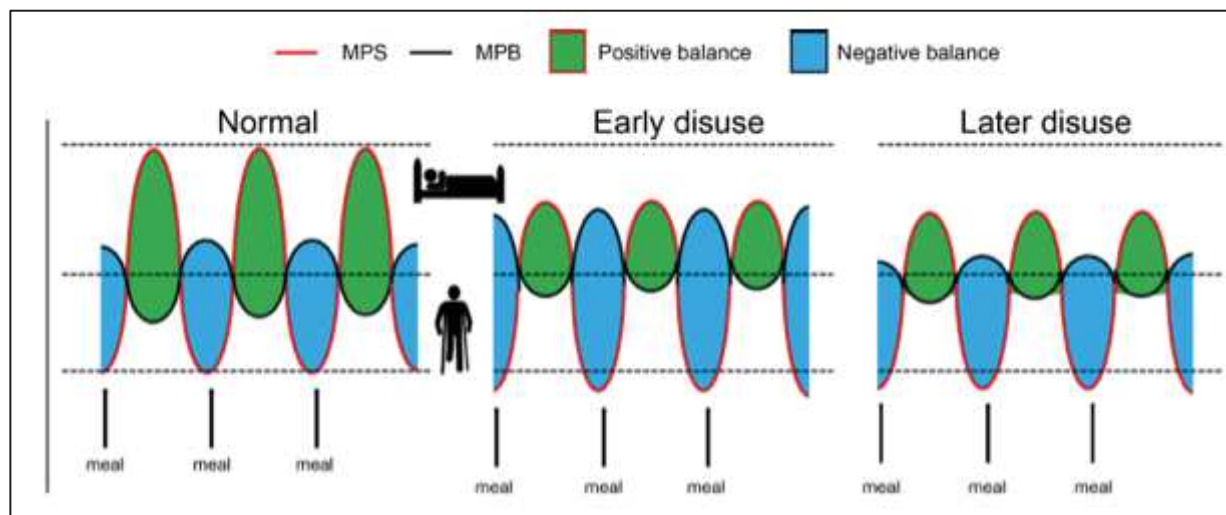
activer le récepteur tyrosine kinase MuSK. Cela conduit à la stabilisation et au regroupement d'AChR *via* Dok-7 et d'autres mécanismes qui impliquent également la rapsyn. Cette voie de signalisation agrin-MuSK-Lrp4 est d'une importance capitale pour l'établissement et le maintien des jonctions neuromusculaires. Les mutations de l'un de ses composants ne sont pas viables ou entraînent le développement de troubles graves de la transmission neuromusculaire appelés syndromes myasthéniques congénitaux (CMS en anglais) (Engel *et al.*, 2015; Tintignac *et al.*, 2015). En outre, le remodelage de la jonction neuromusculaire qui implique une réorganisation des patches AChR pour maintenir un ajustement pré-post-synaptique rigoureux semble nécessiter un clivage local de l'agrin. Ceci est exécuté par la protéase neurotrypsine et laisse un fragment d'agrine C-terminal (CAF, Figure 23), qui devient soluble et circule dans le sang. Étant donné un remodelage massif de la jonction neuromusculaire au cours de certaines formes de déconditionnement musculaire et surtout pendant la sarcopénie, l'utilisation de la CAF circulante comme outil de diagnostic de la désintégration de la jonction neuromusculaire est devenue un concept attrayant (Kalinkovich & Livshits, 2015). En effet, les récentes études cliniques ont soutenu l'efficacité de la CAF en tant que biomarqueur de la sarcopénie principalement chez les hommes (Fragala *et al.*, 2014; Hettwer *et al.*, 2013; Marzetti *et al.*, 2014). Cependant, la taille des échantillons dans ces études est encore faible.

4. Déconditionnement musculaire et balance protéique

De nombreuses études ont rapporté des résultats consensuels sur les deux versants de la balance protéique en réponse à des situations d'hypoactivité. Globalement les deux versants de la balance protéique sont altérés avec des nuances importantes en fonction de la durée de la période d'inactivité et de la typologie musculaire. En effet, la synthèse protéique est touchée quasi immédiatement et son altération perdure dans le temps ne revenant jamais au niveau basal pour des muscles lents oxydatifs (Atherton *et al.*, 2016). L'atteinte de la synthèse protéique semble inversement corrélée avec le phénotype rapide du muscle. De l'autre côté dès les premiers instants d'hypoactivité, il semble qu'il y ait une activation des systèmes protéolytiques dans les muscles oxydatifs qui soit supérieure à celle des muscles rapides (Atherton *et al.*, 2016)

4.1. Déconditionnement et activation des systèmes protéolytiques

Il est important de noter que 80% du volume de la fibre musculaire est occupé par des protéines (Hoppeler, 1986). Les mécanismes de dégradation des protéines (protéolyse) ont une part importante dans l'induction de l'atrophie musculaire comme décrit dans de nombreuses études (Bodine, 2001; Bonaldo & Sandri, 2013; Gomes *et al.*, 2012; Sandri, 2013; Sandri *et al.*, 2004).



La Figure 24 illustre les variations des flux de synthèse et de dégradation protéiques dans différentes conditions d'activité physique. Lors d'une situation d'hypoactivité de moins de 10 jours (« early disuse ») ou de plus de 10 jours (« later disuse »), les flux de synthèse (MPS) sont largement diminués et engendrent une balance protéique négative. Les flux de dégradation (MPB) protéique sont également augmentés dans les 10 premiers jours mais reviennent à des valeurs basales après 10 jours d'hypoactivité, soulignant le rôle majeur joué par la diminution de la synthèse dans les processus de perte de masse dans des situations chroniques au long court de réduction d'activité. Extrait d'Atherton *et al.* (2016).

Ainsi 4 voies majeures de la dégradation des protéines ont été décrites par la littérature scientifique afin d'expliquer ces oscillations de la balance protéique : le système des calpaïnes, l'autophagie, l'apoptose et le système ubiquitine-protéasome.

4.2. Le système des calpaïnes

Ce système calcium-dépendant est responsable d'une digestion partielle de protéines cibles. Composées de 14 membres dans le tissu musculaire, celles ayant une activité majeure au sein

du tissu musculaire sont représentées par les calpaïnes 1 et 2 et 3, dont l'activité dépend de la concentration intracellulaire de calcium (Ca^{2+}). Les myosines, les troponines, la tropomyosine, la titine, la dystrophine, la desmine sont aujourd'hui connus comme étant les substrats principaux du système des calpaïnes (Huang & Zhu, 2016; R. M. Murphy, 2010).

Ce système est donc étroitement lié à la dégradation partielle des structures du cytosquelette, ce qui est en concordance avec une augmentation de l'activité des calpaïnes dans des conditions de perte de masse musculaire. Ceci vaut également pour d'éventuels traitements aux glucocorticoïdes ou lors de dénervation (Fareed *et al.*, 2006; Matsumoto *et al.*, 2014; Nelson *et al.*, 2012). Néanmoins, une alternative permettant d'inhiber la dégradation protéique a été démontré via ce système. En effet, l'inhibition de la calpaïne 2 permet de limiter les flux de dégradation protéique (Huang & Forsberg, 1998; Purintrapiban, Wang, & Forsberg, 2003).

4.3. Le système ubiquitine protéasome

Le système ubiquitine-protéasome (SUP) joue un rôle majeur dans de nombreux processus cellulaires. Ce système est un processus ATP dépendant impliquant une cascade de réactions enzymatiques conduisant in fine un substrat au protéasome dans lequel il sera dégradé (Geng, Wenzel, & Tansey, 2012; Goldberg, 2003; Lecker, Goldberg, & Mitch, 2006).

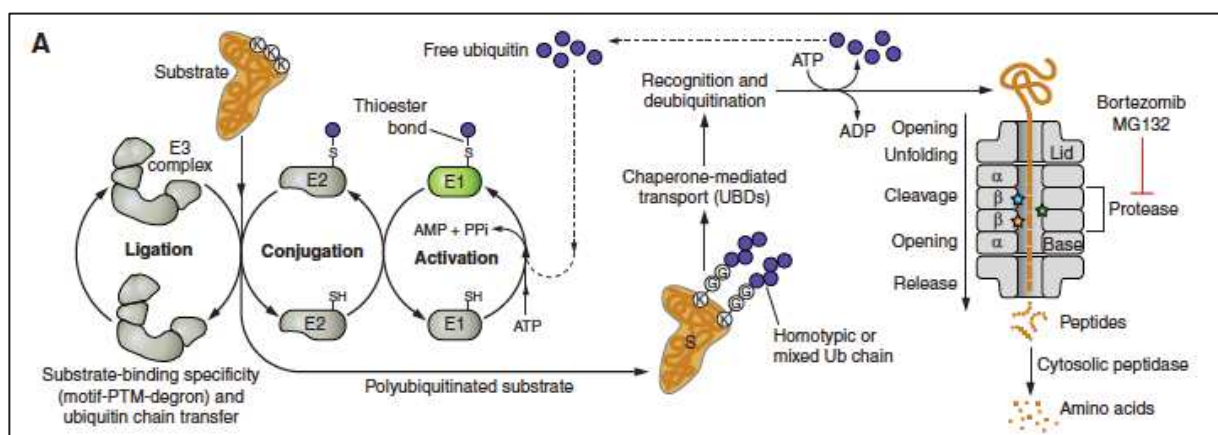


Figure 25 - Le système ubiquitine-protéasome (Bonaldo & Sandri, 2013)

Représentation schématique des différentes étapes du système ubiquitine-protéasome permettant de dégrader des protéines reconnues de manière spécifique par des E3 ligases. Les cibles de MuRF1, MAFbx (ou atrogin-1) et Fbxo40 sont présentées.

L'ubiquitine, petite protéine de 9kDa, joue un rôle central dans ce système en se fixant sur les résidus lysine des protéines. Lorsque les protéines et substrats sont poly-ubiquitinés, ils sont dirigés vers le protéasome pour être dégradés. Cette poly-ubiquitination nécessite plusieurs enzymes clés. La première enzyme (E1 ou ubiquitin activating enzyme) au fonctionnement ATP-dépendant, d'activer les ubiquitines. La deuxième (E2 ou ubiquitin conjugating enzyme) permet d'effectuer la liaison des ubiquitines avec le substrat. La catalyse permet une fixation covalente sur les protéines cibles. Enfin, la dernière enzyme (E3 ou ubiquitin protein ligase) agit comme sélection du substrat grâce à des sites de liaisons spécifiques. Pour finir, il est à noter que les «deubiquitinating enzymes » (DUBs) catalysent la réaction inverse et permettent alors de désubiquitiner les protéines (Geng *et al.*, 2012). Le protéasome musculaire 26S est une protéase multi-catalytique, nucléaire et cytosolique. Ce complexe protéolytique de 2500kDa est formé par l'association du protéasome 20S, responsable de la dégradation du substrat, et du complexe régulateur 19S contrôlant l'entrée du substrat à dégrader (Goldberg, 2003). A l'entrée du protéasome, le substrat est désubiquitiné permettant alors le recyclage des ubiquitines initialement recrutés pour ensuite dégrader les protéines en peptides. Ce système semble être le plus impliqué dans l'atrophie musculaire dans différentes situations de déconditionnement.

L'utilisation d'inhibiteurs spécifiques du système ubiquitine protéasome (comme le MG132 par exemple) permettrait de limiter l'atrophie induite par différentes situations chez l'animal (Caron *et al.*, 2011; Jamart *et al.*, 2011; Tawa, Odessey, & Goldberg, 1997; Zhang *et al.*, 2013). L'étude de Jamart *et al.* (2011) a démontré une diminution de 50% de la perte de masse musculaire engendrée par 6 jours de HU chez la souris (Jamart *et al.*, 2011).

La découverte majeure de deux E3 ligases clés a été l'identification, MAFbx (muscle atrophy F-box protein) et MuRF1 (muscle ring finger protein 1) dans l'atrophie musculaire (Bodine, 2001; M. D. Gomes *et al.*, 2001). L'augmentation de l'expression de ces deux E3 ligases, nommées « atrogènes », est associée à de nombreuses situations de déconditionnement musculaire primaire ou secondaire (Bodine & Baehr, 2014a). L'E3 ligase MuRF1 est impliquée dans la dégradation des protéines de structure et du métabolisme glucidique. Elle cible les chaînes lourdes et légères de myosine ou la pyruvate déshydrogénase. L'atrogène MAFbx est quant à elle plus impliquée dans la diminution de la synthèse protéique *via* la dégradation de la protéine eIF3f, essentielle à l'initiation de la traduction, mais également *via* la dégradation de MyoD, un facteur de transcription myogénique (Bodine & Baehr, 2014b; Csibi *et al.*, 2009; Lagirand-Cantaloube *et al.*, 2008). Cependant, outre la découverte majeure

des atrogènes, de nombreuses autres E3 ligases ont été par la suite découvertes et ayant un rôle majeur dans les mécanismes d'atrophie musculaire (Sandri, 2013; Schiaffino *et al.*, 2013) tels que TRIM32, TRAF6, FBxo40, Nedd4, TRIM62.

4.4. Le système autophagique-lysosomal

Le processus autophagique apparaît comme primordial au sein du tissu musculaire (Masiero *et al.*, 2009; Masiero & Sandri, 2010). Ces auteurs montrent clairement que l'absence du processus autophagique au sein du tissu musculaire mène à l'atrophie du muscle squelettique. Cependant, une hyperactivité du processus autophagique conduit également à une atrophie ainsi qu'à des pathologies musculaires (Kaneda *et al.*, 2003; Mammucari *et al.*, 2007; Sandri, 2010; Zhao *et al.*, 2007).

Le système autophagique lysosomal apparaît comme étant un système majeur dans le contrôle de la masse. Suite à un stress cellulaire ou stimulus environnemental, l'autophagie s'avère être le mode de réponse optimale à une situation de survie. Ceci permet à la cellule de réutiliser les protéines dégradées telles que les mitochondries pour générer de nouveaux substrats utiles au métabolisme et permettre le maintien de l'activité cellulaire (Sandri, 2010).

L'autophagie est la seule voie qui puisse dégrader massivement des macromolécules et des organites, elle représente la voie de dégradation alternative à celle du système ubiquitine-protéasome (Klionsky & Emr, 2000). C'est un système qui implique deux types de vésicules, l'autophagosome qui capture dans un premier temps les substrats, et le lysosome, qui dans une étape ultérieure, fusionne avec l'autophagosome et le dégrade avec ses constituants (Levine & Klionsky, 2004). Afin de dégrader les substrats, les lysosomes contiennent des hydrolases qui sont pH-dépendant (pH 4 à pH 5.5) et catalysent l'hydrolyse de toutes les molécules (protéines, glucides, lipides et acides nucléiques) (Roberts *et al.*, 2003). On peut compter parmi les hydrolases, des protéases, des phosphatases, des glycosidases et des lipases (Bechet *et al.*, 2005). De plus, une quinzaine de protéines Atgs (Autophagy related genes) sont nécessaires à la biogenèse de l'autophagosome. Ces Atgs, recrutées dans le cytoplasme, s'agrègent les uns aux autres, s'associent de façon transitoire à la membrane pré-autophagosomale et à celle de l'autophagosome et sont nécessaires pour l'induction de l'autophagie. Plus précisément, le complexe Ulk1-Atg13-FIP200 joue un rôle clé dans l'initiation de l'autophagie. Il peut être phosphorylé par mTORC1, menant à son inhibition, et

par AMPK, menant à son activation (Jung *et al.*, 2010). Une fois le complexe actif, Ulk1 phosphoryle Beclin1 sur la ser-14, permettant l'activation de Vps34 et ainsi l'induction de la formation de l'autophagosome (Russell *et al.*, 2013). La formation de l'autophagosome implique ensuite l'action de nombreux Atgs, et notamment de LC3 (microtubule-associated protein light chain 3) nécessaire à l'élongation et la formation d'un autophagosome mature. Un pro-LC3 est d'abord clivé par Atg4 pour former l'isoforme LC3-I, qui, une fois conjuguée au phosphatidylethanolamine de la membrane autophagosomale par l'action de Atg7, devient LC3-II (Nakatogawa, Ichimura, & Ohsumi, 2007). Il est important de noter que la protéine p62 est couramment employée en tant que marqueur de l'activité lysosomale puisqu'elle est dégradée au même titre que l'autophagosome et ses composants.

Des conditions de dénervation et de privation alimentaire ont démontré chez l'animal une augmentation de l'autophagie chez l'animal (Mammucari 2007). Une augmentation de l'expression de différents marqueurs liés à l'autophagie, tels que Beclin-1 ou LC3-II/LC3-I, a été également retrouvée chez l'homme après 21 jours de bedrest (Brocca *et al.*, 2012).

4.5. Le système de l'apoptose

L'apoptose est une voie de mort cellulaire programmée essentielle, car indispensable pour l'homéostasie tissulaire, le développement embryonnaire et l'immunité. Fait important, l'apoptose dérégulée joue un rôle majeur dans le développement de la tumeur, les troubles neurodégénératifs et les maladies auto-immunes (Czabotar *et al.*, 2014; Delbridge *et al.*, 2016). En raison de sa pertinence biologique et de ses applications thérapeutiques, l'apoptose a été largement étudiée au cours des trois dernières décennies.

Dans des conditions d'hypoactivité ou de réduction d'activité, l'objectif principal est de comprendre le devenir moléculaire des protéines dans l'atrophie musculaire. Dans ce contexte, il a été suggéré que l'apoptose ou mort cellulaire programmée ; pouvait contribuer potentiellement à la réponse atrophique en réduisant le nombre de noyaux musculaires et ainsi diminuer le domaine myonucléaire. L'apoptose est donc un programme évolutif essentiel lors de l'embryogenèse, le développement et le maintien de l'homéostasie tissulaire. Dans le muscle squelettique, l'apoptose peut contribuer à la sarcopénie et à la cachexie. Ainsi, il n'est pas clair si la perte de noyaux initie ou est une conséquence de la réduction de la masse musculaire lors de l'atrophie.

La famille Bcl-2 et les inhibiteurs des protéines d'apoptose, sont considérés comme des protéines anti-apoptotiques en participant directement au contrôle de l'équilibre entre les protéines pro et anti-apoptotiques. Le rapport Bcl-2 / Bax est souvent utilisé comme indicateur du potentiel apoptotique où un ratio élevé protège contre l'apoptose et un faible ratio favorise l'apoptose (Antonsson *et al.*, 1997). Parmi les différents mécanismes caractérisant l'apoptose, les caspases se sont révélés être des déterminants enzymatiques centraux impliqués dans les différentes étapes de l'apoptose, c'est-à-dire de son initiation (caspase 8, 9, 12) à l'exécution de l'apoptose (caspase 3, 6, 7) (Dupont-Versteegden, 2006). Ces protéases spécifiques de l'aspartate dépendantes de la cystéine se trouvent normalement dans le cytoplasme dans un état procaspase inactif. Cependant, ces procaspases peuvent être facilement activées lors du clivage protéolytique (Danial & Korsmeyer, 2004)

4.6. Déconditionnement et altération de la synthèse protéique

La perte de masse musculaire expérimentée lors d'aliments prolongés est principalement due à la diminution de la synthèse des protéines plutôt qu'à une augmentation de la dégradation (Ferrando *et al.*, 1996 ; Biolo *et al.* 2004a, b) induisant un bilan protéique négatif (Scheld *et al.*, 2001).

Si l'augmentation de l'activité des systèmes protéolytiques est nécessaire pour induire une atrophie musculaire, la littérature scientifique a également montré que la diminution des processus de synthèse protéique l'est tout autant. La revue très récente de Atherton *et al.* (2016) souligne le rôle majeur de la diminution des flux de synthèse lors du déconditionnement musculaire (associé ou non à une pathologie). En effet, les flux de synthèse, post-prise alimentaire, sont par exemple largement diminués après immobilisation d'une articulation (Glover *et al.*, 2008). L'étude de Stein *et al.* (1999) a également démontré une diminution de la synthèse protéique chez des astronautes sur des longues durées de vols spatiaux (supérieures à 3 mois). Une diminution des flux de synthèse protéique musculaire après 14 jours de bedrest a également été observée dans la littérature (Ferrando *et al.*, 1996). Chez l'animal, des études ont montré que seulement 3 jours d'hypoactivité suffisaient pour engendrer une diminution des flux de synthèse (Gomes *et al.*, 2012). Dans ce modèle de déconditionnement (HU) les flux de synthèse continuent de diminuer pendant 7 jours puis restent stables. Une perte de masse musculaire est donc simultanément liée à une

augmentation des processus cataboliques et une diminution des processus anaboliques, et de manière prédominante pour les muscles posturaux (Atherton *et al.*, 2016).

Au niveau cellulaire, la voie PI3k/Akt/mTOR constitue la voie majeure de la synthèse des protéines musculaires (Miyazaki & Esser, 2009; Mounier *et al.*, 2011). PI3k permet d'augmenter l'activité de la Protéine Kinase B, également dénommée Akt. Cette kinase joue un rôle inhibiteur sur le complexe suppresseur de tumeur TSC1/TSC2 en phosphorylant TSC1 sur les Ser-939/981 et la Thr-1462 (Manning & Cantley, 2003). TSC2 est alors incapable d'exercer le rôle inhibiteur qu'il exerce normalement sur la protéine Rheb, un activateur de mTOR, conduisant ainsi à son activation. A l'inverse, lorsque la voie Akt n'est pas activée, TSC1/TSC2 inhibe l'activité de mTOR par l'intermédiaire de Rheb (Miyazaki & Esser, 2009). mTOR (mammalian Target of Rapamycin) est une Serine/Thréonine kinase très conservée dans l'évolution des espèces. Elle exerce un rôle essentiel au sein de la cascade signalétique PI3k/Akt/mTOR. La protéine mTOR représente l'unité catalytique présente dans 2 complexes distincts, mTORC1 et mTORC2.

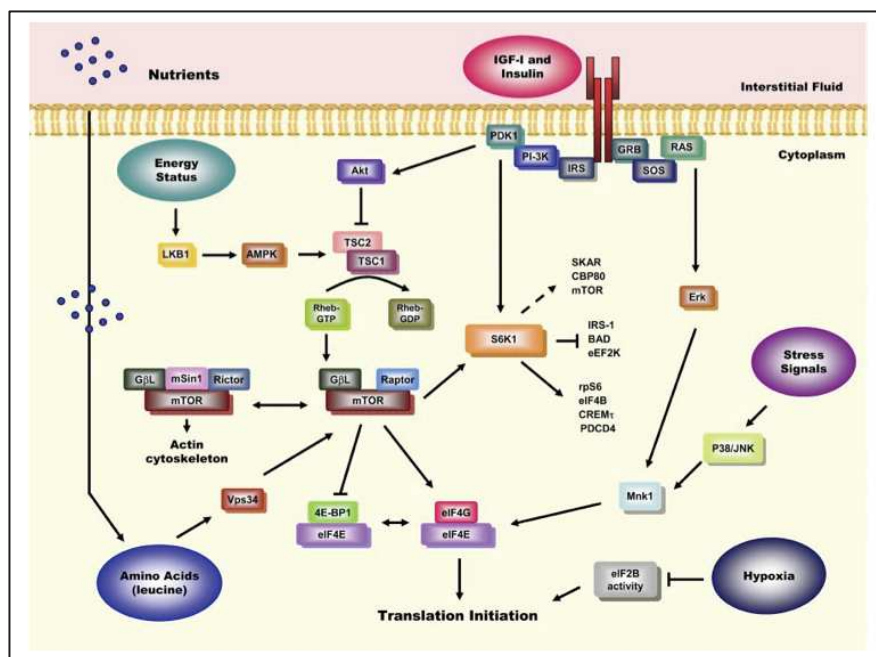


Figure 26 - PI3K/Akt/mTOR : principale voie de synthèse protéique

Ce schéma présente les acteurs principaux de la voie PI3K/Akt/mTOR régulant l'initiation de la translation des protéines. De nombreux stress/stimuli permettent de moduler cette voie tels que la disponibilité en nutriments, l'hormone de croissance IGF-1 ou encore l'hypoxie. Extrait de Lang, Frost, and Vary (2007)

Ce complexe multi-protéique joue également un rôle inhibiteur sur l'autophagie (Jung *et al.*, 2010). En se liant au facteur d'initiation à la traduction eIF3f, mTORC1 peut phosphoryler ses substrats 4E-BP1 et S6K1 pour initier la traduction protéique. Après phosphorylation, S6K1 se dissocie de eIF3f et active la traduction ribosomale en phosphorylant la protéine ribosomale S6. S6K1 est également responsable d'un rétrocontrôle positif en activant mTORC1 par phosphorylation de ses résidus Thr-2446 et Ser-2448 (Chiang & Abraham, 2005; Holz & Blenis, 2005).

Cette voie PI3K/Akt/mTOR, reconnue comme essentielle pour maintenir une balance protéique positive, est donc largement perturbée lors de la perte de masse musculaire. Les nombreux acteurs qui influencent cette voie de signalisation sont autant de marqueurs utilisés par les études scientifiques voulant évaluer l'impact d'une diminution de cette voie sur le déconditionnement musculaire. Chez l'animal, l'étude de Bodine, Stitt, *et al.* (2001) a par exemple démontré que 14 jours de hindlimb unloading diminuaient l'activité de nombreux marqueurs de cette voie incluant Akt ou S6K1 par exemple.

Partie 3 : Objectifs de la thèse

Le muscle squelettique joue un rôle central dans la physiologie et l'adaptation métabolique en réponse à l'environnement en impesanteur. Le déconditionnement musculaire, induit par l'inactivité chronique et l'impesanteur se traduit par une perte de masse et de force musculaire, ainsi qu'une augmentation de la fatigabilité. Dans ce contexte, il s'agit toujours actuellement de valider et de proposer des stratégies d'intervention pour maintenir la fonction et l'intégrité du muscle squelettique lorsque celui-ci est soumis à un environnement en impesanteur.

Ces travaux de thèse se sont inscrits au sein de l'équipe « Remodelage Musculaire et Signalisation » du laboratoire UMR 866 INRA Dynamique Musculaire et Métabolisme. La partie expérimentale de nos travaux a pour objectif principal de caractériser les altérations précoces du muscle strié squelettique à l'aide d'un modèle d'impesanteur simulée, appelé immersion sèche ou Dry Immersion (DI). Ce modèle est scientifiquement reconnu depuis plusieurs années par les scientifiques russes pour être plus sévère que l'alitement prolongé et a été mis en place il y a quelques années pour la première fois en Europe, et plus précisément en France, à Toulouse. Cette première étude menée en Europe nous a permis de caractériser les changements précoces du déconditionnement musculaire au niveau structural et fonctionnel.

Une seconde étude nous a permis d'évaluer les effets d'un cocktail anti-oxydant, anti-inflammatoire comme contremesure lors d'une réduction d'activité de 20 jours et lors d'un bed rest de 2 mois.

Les résultats de nos études à courts et longs termes du déconditionnement musculaire devraient participer à la définition des événements précoces et déclencheur du déconditionnement et de la fragilisation musculaire induite par une réduction chronique d'activité, et contribuer à optimiser les effets des contremesures sur cette période initiale.

Ces travaux de thèse ont donc participé à la préparation de futures missions habitées interplanétaires, mais également à la valorisation des résultats de la recherche spatiale dans le secteur de la santé.

Chapitre 2 : Étude du déconditionnement musculaire suite à 3 jours d'immersion sèche

Préambule



Les missions actuelles sur la Station spatiale internationale (ISS) et la future exploration de la Lune ou de Mars impliquent la programmation de missions à long terme. Dans ce contexte, plusieurs études ont déjà démontré l'impact négatif de l'impesanteur sur la physiologie humaine et en particulier, les effets néfastes sur la structure et la fonction de l'appareil musculo-squelettique. Comme décrit dans le premier chapitre, le déconditionnement musculaire est principalement caractérisé par une perte de masse musculaire, une diminution de la section transversale des fibres, une réduction de la force, des changements dans le phénotype, une fatigabilité accrue, une résistance à l'insuline et une augmentation des infiltrations graisseuses. Ces changements se traduisent par une déficience motrice, ce qui réduit considérablement la capacité de travail globale. L'exposition continue de bénévoles sains à une déclivité de -6° tout en reposant dans des lits a été démontrée comme un excellent modèle pour de nombreux changements physiologiques observés dans les vols spatiaux. Cependant, un autre modèle expérimental peut être exploré pour supprimer toutes les zones de soutien préférentielles sur une période courte ou longue, c'est-à-dire "immersion sèche" (Dry Immersion - DI). Le modèle DI a été développé en premier pour la physiologie spatiale par des scientifiques russes (IBMP).

Les objectifs de cette expérimentation étaient multiples. Dans un premier temps, une analyse fonctionnelle et structurelle du quadriceps a été réalisée, associant des tests de force, des évaluations de tonus musculaire, une caractérisation immunohistologique de la myotypologie ainsi qu'une analyse IRM du volume du quadriceps et enfin un marquage indirect de dénervation. Cette première analyse a permis la publication d'un article original dans la revue *The Journal of Physiology* (Demangel *et al.*, 2017).

Ce protocole nous a offert l'opportunité de caractériser les effets du déconditionnement musculaire sur du court terme, à savoir ici 3 jours. En effet, comme précisé plus tôt dans le document, la plupart des études sur le déconditionnement musculaire ont été réalisées à l'aide du modèle Bedrest sur des périodes allant de 10 à 60 jours en moyenne. Or, c'est dans la phase initiale du déconditionnement que le degré de perte de masse musculaire est le plus important. Aussi, un des objectifs était de caractériser les événements précoces du déconditionnement musculaire d'un point de vue cellulaire et moléculaire et d'identifier les réseaux de gènes et voies signalétiques activées précocement. Ce modèle sévère et drastique mimant l'impesanteur pendant 3 jours est reconnu pour apporter les mêmes effets que des allègements prolongés de 14 jours en terme de degré d'atrophie musculaire. Ce protocole

expérimental de 3 jours nous a donc permis d'obtenir des biopsies de muscles squelettiques de chaque sujet avant et quelques heures avant la fin de la période de 3 jours d'immersion sèche. Les échantillons de muscle squelettique issus du Vastus Lateralis ont été partagés en plusieurs morceaux afin de préparer des blocs pour l'histologie, et d'autres pour la biochimie et la biologie moléculaire.

Pour cette première expérimentation d'immersion sèche réalisée sur sujets sains, une analyse des transcrits de type RNAseq a été utilisée nous permettant de décrire la nature et l'ampleur des changements observés dans l'expression des gènes dans les muscles squelettiques des humains soumis à une immersion sèche à court terme.

De manière originale et grâce à l'utilisation du Myoton, nous avons pu récolter des données fonctionnelles musculaires et mettre ces données en relation avec les données biochimiques.

Enfin, dans un deuxième temps, cette expérimentation était également opportune pour étudier les événements précoces s'il en est du développement de l'adiposité musculaire ectopique liée à l'inactivité sévère.

1. Présentation du protocole général

Cette étude s'est effectuée sur 12 hommes volontaires sains. Chaque volontaire a été admis en clinique en deux temps. Une première période d'un jour, de 7h00 à 19h00, situé entre 15 et 8 jours avant le début du protocole afin d'effectuer une biopsie musculaire et une prise de sang. Une deuxième période quelques jours plus tard concerne la partie principale et primordiale de l'étude. Durant 8 jours les sujets sont donc admis à la clinique. Ils arrivent à la clinique en fin d'après-midi, 4 jours avant le début de l'expérience (BDC-4). 3 jours d'ambulation (BDC-3, BDC-2, BDC-1) servent de période de contrôle pour les sujets. À la fin de ces 4 jours, débute l'expérience d'immersion sèche pendant 3 jours (DI1, DI2, DI3). Enfin, 2 jours de réambulation suivent la période d'immersion et permettent l'évaluation des différents paramètres post immersion (Figure 27).

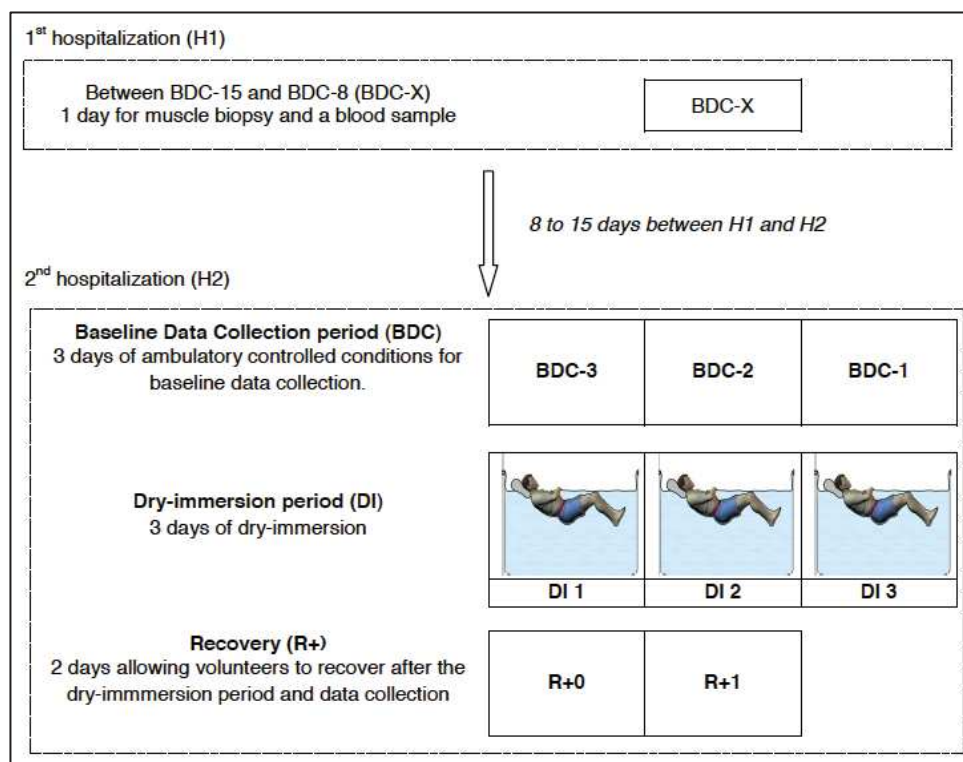


Figure 27 - Schéma du protocole expérimental de l'immersion sèche (DI)

Schéma du protocole expérimental de l'immersion sèche en deux étapes. La première, nommée H1, consiste uniquement au prélèvement musculaire par biopsie au niveau du Vastus Lateralis. Cette opération sur un seul jour se trouve être entre 8 et 15 jours avant le début du protocole expérimental pour chaque patient. La seconde étape, nommée H2, est quand à elle longue de 8 jours. L'arrivée de sujets se fait 3 jours avant le début du protocole pour collecter toutes les données contrôles utiles et nécessaires. À cela, suivent les 3 jours de protocole d'immersion sèche, et enfin deux jours de réhabilitation et de collecte de données à la suite des 3 jours d'immersion sèche.

2. Les conditions de participation : de l'éthique aux critères nécessaires de l'étude

2.1. Numéro d'éthique

Ce projet clinique a été mené conformément aux principes établis par la 18^{ème} Assemblée médicale mondiale (Helsinki, 1964) et toutes les modifications applicables énoncées par les assemblées médicales mondiales et les lignes directrices de l'ICH pour les bonnes pratiques cliniques (GCP). À ce titre le numéro d'éthique de l'étude est ID RCB : 2014-100904-43.

2.2. Informations des participants et formulaire de consentement

L'enquêteur (selon les exigences réglementaires applicables) ou une personne désignée par l'enquêteur et sous la responsabilité de l'enquêteur doit informer pleinement le sujet de tous les aspects pertinents du projet clinique, y compris l'information écrite donnant l'approbation ou l'avis favorable du comité d'éthique (CPP). Avant la participation d'un sujet au projet clinique, le formulaire de consentement éclairé doit être signé, rempli et daté par le sujet et par la personne qui a mené la discussion sur le consentement éclairé. Une copie du formulaire de consentement éclairé, signée et datée, sera fournie au sujet. Le formulaire de consentement éclairé utilisé par l'enquêteur pour obtenir le consentement éclairé du sujet doit être examiné et approuvé par le promoteur avant de le soumettre au comité d'éthique compétent (CPP) pour approbation / avis favorable.

2.3. Recrutement et critères d'inclusion/exclusion

La sélection s'est déroulée en deux phases. Premièrement, une sélection préliminaire sur la base des dossiers d'application, comprenant d'abord un questionnaire sur le mode de vie du sujet, son parcours scolaire et son expérience professionnelle; et un deuxième questionnaire médical sur les antécédents médicaux personnels et familiaux. Secondement, une séance de sélection, comprenant des examens cliniques et paramédicaux est effectuée lorsque les enquêtes ont été menées (Medes Space Clinic).

Les candidats sont déclarés aptes à participer à l'expérience si le document d'information a été lu attentivement. Les candidats ont eu la possibilité de poser toute question supplémentaire concernant le projet de recherche. Après avoir obtenu des réponses satisfaisantes à ces

questions, ils ont alors signé le formulaire spécifique d'information et de consentement. Après avoir vérifié les résultats des tests, tous les critères d'inclusion ont été vérifiés.

Le nombre de sujets a été estimé au préalable à environ 24 bénévoles, présélectionnés sur la base de leurs fichiers. Ceci a eu pour objectif de ne sélectionner que 14 bénévoles (12 + 2 sujets de réserve par précaution). Les bénévoles présélectionnés ont reçu un document d'information et de consentement, afin d'être pleinement informés et en mesure de prendre leur décision de participer ou non à l'expérience (après avoir lu attentivement le document d'information). Ces volontaires ont été informés d'une visite de sélection au MEDES pour vérifier s'ils répondaient (ou non) aux exigences des critères énumérés ci-dessous.

2.3.1. Les critères d'inclusion de l'étude

Les critères d'inclusion ont donc été les suivants : **i)** volontaire masculin en bonne santé (voir ci-dessous la description des tests médicaux et des analyses de laboratoire effectuées lors de la visite de sélection, voir 2.4.2), **ii)** être âgé de 20 à 45 ans, **iii)** ne pas présenter de poids excessif ni de minceur excessive avec l'Indice de Masse Corporel (IMC : poids (kg) / hauteur (m²) entre 20 et 26, **iv)** avoir une taille entre 158cm et 190cm, **v)** présenter aucun bilan personnel ni familial de maladies chroniques ou aiguës ou de troubles psychologiques susceptibles d'affecter les données physiologiques et/ou de créer un risque pour le sujet pendant l'expérience ; **vi)** respecter un niveau de condition physique spécifique :

✚ Si âge <35 ans: 35 ml / min. / kg <VO₂max <60 ml / min. / kg,

✚ Si âge > 35 ans: 30 ml / min. / kg <VO₂max <60 ml / min. / kg ;

vii) être actif et libre de tout trouble orthopédique, musculo-squelettique et cardiovasculaire, **viii)** être non-fumeurs, **ix)** ne pas boire d'alcool, pas de toxicomanie et aucun traitement médical, **x)** être couvert par un système de sécurité sociale, **xi)** avoir signé le consentement d'information, **xii)** être libre de tout engagement pendant l'étude.

2.3.2. Les critères d'exclusion de l'étude

Les critères de non-inclusion ont été les suivants : **i)** avoir un passé d'intolérance orthostatique, **ii)** avoir des troubles du rythme cardiaque, **iii)** avoir des douleurs chroniques du dos, **iv)** avoir un historique de hernie hiatale ou de reflux gastro-oesophagien, **v)** avoir un historique de dysfonctionnement thyroïdien, des calculs rénaux, du diabète, des migraines, **vi)** avoir des enregistrements antérieurs de thrombophlébite, antécédents familiaux de thrombose ou réponse positive dans la procédure de dépistage de la thrombose (anti thrombine III, S-protéine, protéine C, mutation de Leiden du facteur V et mutation 20210 du gène de la prothrombine), **vii)** avoir des résultats anormaux pour les membres inférieurs à l'échodoppler, **viii)** avoir un historique de claustrophobie active, **ix)** un historique de maladies musculaires et osseuses génétiques de toute nature, **x)** une densité minérale osseuse: T-score \leq -1.5 sur la hanche, **xi)** présence de matériel d'ostéosynthèse, présence d'implants métalliques, **xii)** un historique de problèmes de genou ou chirurgie articulaire / jambe cassée, **xiii)** une faible tolérance à l'échantillonnage du sang, **xiv)** avoir administré du sang (plus de 8 ml/kg) dans une période de 8 semaines ou moins avant le début de l'expérience, **xv)** avoir une contre-indication à la lidocaïne, **xvi)** avoir un régime alimentaire spécial, végétarien ou végétalien, **xvii)** avoir une allergie alimentaire, être positif à l'un des tests suivants: HVA IgM (hépatite A), antigène HB (hépatite B), anticorps anti-HVC (hépatite C), anticorps anti-VIH1 + 2, **xviii)** si après une échocardiographie: fenêtre acoustique thoracique inappropriée, **xix)** refuser de donner l'autorisation de contacter son médecin généraliste, **xx)** avoir un historique d'incarcération, **xxi)** sujet qui, selon le jugement de l'enquêteur, est susceptible d'être non conforme à l'étude, ou incapable de coopérer en raison d'un problème de langue ou d'un mauvais développement mental, **xxii)** être un sujet d'étude qui a reçu plus de 4500 euros dans les 12 mois pour être un sujet de recherche, **xxiii)** être un sujet soumis à la tutelle ou à la cotutelle.

3. Présentation des données anthropométriques des sujets de l'étude

Les données anthropométriques des 12 sujets du protocole d'immersion sèche sont présentées dans le Tableau 2 ci-après.

Les détails concernant l'âge, la taille, le poids de corps et l'indice de masse corporel sont présentés pour chaque sujet nommé de A à L..

Sujets	Age (ans)	Taille (cm)	Poids de corps (kg)	Indice de masse corporel
A	39	167	66.6	23.9
B	39	183	86.2	25.7
C	34	172	77.9	26.3
D	36	183	71.7	21.4
E	33	184	73.5	21.7
F	26	174	72.1	23.8
G	30	174	66.7	22.0
H	28	182	80.8	24.4
I	34	189	86.1	24.1
J	26	178	68.8	21.7
K	30	180	77.0	23.8
L	26	169	66.2	23.2
Moyenne	32 ± 5	178 ± 7	74.5 ± 7.2	23.5 ± 1.6

Tableau 2 - Données anthropométriques des 12 sujets participants à l'immersion sèche de 3 jours

L'âge, la taille, le poids de corps, et l'indice de masse corporel avant 3 jours d'immersion sèche sont présentés dans le tableau ci-dessus. Les données représentées sont les moyennes (\pm SD).

4. Présentation du chronogramme détaillé de l'expérimentation et des différents tests effectués lors du séjour dans la clinique spatiale

Ci-contre, le détail précis de la prise en charge des sujets de leurs arrivées à la clinique spatiale jusqu'à leurs sorties (Figure 28).

Les sujets arrivaient à la clinique spatiale, au MEDES, CHU de Rangueil à Toulouse à BDC-4 à 16h00. De manière précise, le petit déjeuner et le diner étaient quotidiennement prévus à 8h00 et 19h00 après avoir recueillis les urines des sujets le matin ; et après avoir vérifié leurs signes vitaux. Le déjeuner était programmé à 12h00 chaque jour. À BDC-3, les sujets effectuaient les différents tests de force et notamment la contraction maximale isométrique volontaire du quadriceps (test qui nous intéressera pour la suite de l'étude).

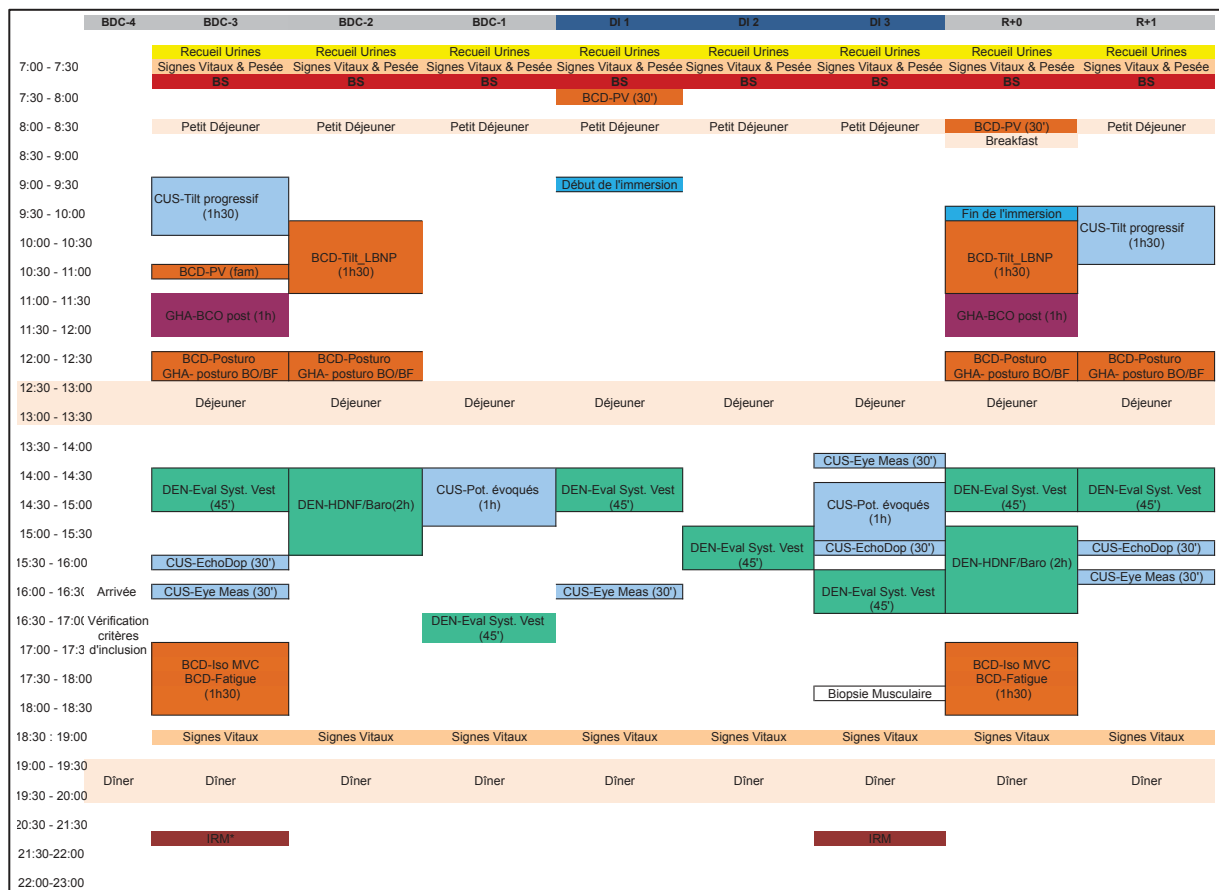


Figure 28 - Chronogramme détaillé de l'arrivée des sujets à la clinique jusqu'à leur départ du protocole expérimental de l'immersion sèche de 3 jours.

Présentation du chronogramme détaillé des sujets pendant leurs séjours à la clinique spatiale. Chaque examen est identifié par un créneau horaire spécifique. Cette organisation est stricte et ne peut être modifiée.

Ce point correspondait au point de référence (PRE) de chaque sujet. L'effet du protocole expérimental concernant ce test de force était effectué 8 heures après la fin de l'expérimentation. Il correspond ainsi au point POST. Différents tests et mesures de contrôle étaient également effectués à BDC-2 et BDC-1.

Le protocole d'immersion débutait à 9h00 au jour dit DI 1 et s'achève à la même heure, 3 jours plus tard, soit DI 3. Durant cette période, les sujets sont donc en contexte d'hypoactivité, hypodynamie, mimant un contexte d'impesanteur. Il est important de noter qu'une biopsie musculaire était effectuée au début du 3^{ème} jour de l'immersion sèche, quelques heures avant la réambulation. Cette biopsie du Vastus Lateralis de la jambe droite correspondait au point dit POST. À noter que le point de contrôle (PRE) a été prélevé également par biopsie musculaire entre 7 et 13 jours avant le début du protocole expérimental, soit 4 à 9 jours avant l'entrée dans la clinique, sur la même jambe.

Enfin, des mesures par IRM ont également été effectués 3 jours avant le début de l'expérimentation (PRE) et à la fin du 3^{ème} jour d'immersion (POST). Elles ont été réalisées avec comme objectif de mesurer le volume de la cuisse mais aussi de quantifier le contenu en tissu adipeux au sein des différents groupes musculaires composant la cuisse.

5. Apports contrôlés de la nutrition durant le protocole expérimental

Les apports diététiques ont été quantifiés en mesurant le poids de chaque plat avant et après (en cas de restes) chaque repas et en calculant les apports pour chaque nutriment. Le calcul du contenu alimentaire a été effectué à l'aide d'une base de données spécifiquement construite à partir d'une base de données européenne validée. Au cours de l'ensemble des phases d'hospitalisation, le régime alimentaire a été surveillé. Les sujets ont reçu 3 repas principaux (petit-déjeuner, déjeuner et dîner) et 1 collation par jour (après-midi). Les repas ont été définis par le nutritionniste MEDES, fourni par l'hôpital de Toulouse et livré aux sujets par les assistants de santé sous la supervision du nutritionniste MEDES. Chaque volontaire avait son plateau avec un repas bien équilibré. Chaque catégorie d'aliments a été pondérée et servie en tenant compte de la demande énergétique de chaque sujet. Les sujets devaient finir leur plateau. Dans le cas où ils ne le faisaient pas, les restes ont été pesés à nouveau pour enregistrer la quantité ingérée avec le maximum d'exactitude. L'apport du dîner a été adapté en tenant compte des éventuels restes de déjeuner, de petit-déjeuner et de collations.

En ce qui concerne les principaux aspects nutritionnels, ils sont répartis comme suit. La consommation de liquide était comprise entre 35 et 50 ml/kg/jour. Le premier jour d'hospitalisation, le taux métabolique basal (BMR) a été calculé en kcal/jour en utilisant les équations de l'Organisation Mondiale de la Santé:

$$\hat{\text{Age}} < 30 \text{ ans: BMR} = 15,3 \times \text{poids corporel (kg)} + 679 \quad \text{(équation 1)}$$

$$\hat{\text{Age}} > 30 \text{ ans: BMR} = 11,6 \times \text{poids corporel (kg)} + 879 \quad \text{(équation 2)}$$

Le poids de référence était le poids mesuré le matin de BDC-3, avant le petit-déjeuner. Pendant la période de pré-immersion et la période de récupération, l'apport calorique était égal à 160% de la BMR. Pendant la période d'immersion, l'apport calorique était égal à 130% de BMR. Le BMR mesuré a servi à la planification du régime au lieu d'être calculé chaque fois qu'il était faisable dans la pratique. L'apport en macronutriments a été contrôlé dans les

protéines (1-1.2 g/kg BW/jour, sans supplémentation en protéines de lactosérum), la graisse totale (35-38% TEE) et les glucides (restants). L'ajout d'électrolytes a été contrôlée concernant le sodium (2000 - 4500 mg/jour); Potassium (3000 - 5000 mg/jour); Calcium (900-1200 mg/jour) et chlorure (750 à 4500 mg/jour). Le café, le thé, l'alcool, le tabagisme, les grignotages et les médicaments ont été interdits tout au long de l'expérience. Seul le paracétamol était autorisé si nécessaire.

6. Méthodologie expérimentale de l'étude

6.1. Biopsies musculaires

La biopsie musculaire a été effectuée, pesée et rapidement partagée entre les différentes équipes. Un premier morceau a été identifié pour les analyses immunohistochimique. Un second pour les analyses de protéines, et enfin un troisième pour l'analyse des gènes.

Des études concernant le stress oxydant, les phénomènes de glycosylation ou encore des études sur le métabolisme ont été menés. Pour notre équipe, il a été question d'analyser le degré d'atrophie musculaire, les changements myotypologiques, ainsi que la quantification par western blots des différents marqueurs de la balance protéique, et par RNA-seq l'évaluation des changements au niveau du transcriptome.

6.2. Analyse immunohistochimique des biopsies musculaires

6.2.1. Marquage par immunofluorescence

Un morceau de muscle d'environ 30 à 40 mg pour l'analyse immunohistochimique a été inclus dans un tube en silicone enrobé d'un tissu protecteur type OCT-TissueTek, l'ensemble était alors plongé dans l'isopentane liquide refroidi par l'azote liquide (-196°C). Cette procédure permet non seulement de chasser le liquide intracellulaire et préserver ainsi la structure du muscle, mais aussi de positionner correctement le muscle dans l'OCT et faciliter la réalisation des coupes transversales au cryostat.

Des coupes transversales d'épaisseur de 10 micromètres (μm) ont été réalisées ensuite au cryostat à la température de -25°C (HM-560, Microm H) et déposées sur lames. Le stockage

des échantillons s'effectue dans un congélateur à une température de -80°C jusqu'à leurs traitements.

Avant l'étape d'immunomarquage, les coupes étaient séchées et fixées pendant 10 minutes dans de l'acétone à température ambiante. Les coupes étaient rincées dans du PBS (Phosphate Buffer Saline) à multiples reprises avant d'être perméabilisées et saturées avec un mélange de Triton (0,1%) et de sérum de cheval (20%). Les immunomarquages étaient réalisés en déposant l'anticorps primaire pendant 1 heure à 37°C sur les coupes (Tableau 3). Après avoir rincé au PBS, l'anticorps secondaire permettant d'observer ce marquage en vert ou en rouge était déposé 1 heure à 37°C. Pour finir, un intercalent permettant de visualiser les noyaux en bleu (Hoechst, 1 :1000) était également ajouté avant le montage au permafluor des lames avec une lamelle.

Les fibres marquées par NCAM/CD56 ont été repérées manuellement sur les échantillons globaux. Les images ont été prises avec un microscope à épifluorescence inversée Axiovert 200M (Zeiss) à un grossissement de 63× à l'huile. La caméra utilisée pour prendre des photos était une CCD Kappa.

	Anticorps primaire	Référence	Dilution	Anticorps secondaire	Dilution
Aire de section	Anti-Laminine	L9393, Sigma	1 :200	Alexa 488	1 :800
Myotypologie	MyHC I	BA-D5,DSHB	1 :10	Alexa 568	1 :800
	MyHC II	M4276,Sigma	1 :200	Alexa 488	1 :800
	MyHC IIA	SC-71,DSHB	1 :10	Alexa 568	1 :800
	Hoechst		1 :1000		
Dénervation	NCAM/CD56	555514, Biosciences	1 :500	AF 555	1 :1000

Tableau 3 - Liste des anticorps utilisés pour la myotypologie et la dénervation.

6.2.2. Évaluation du degré d'atrophie des fibres musculaires et des changements myotypologiques

Après avoir effectué l'immunomarquage des différentes coupes avec les différents anticorps, les lames étaient scannées avec un scanner de type Hamamastu – Nanozoomer (INM – Montpellier, France) nous permettant d'obtenir des images en haute définition de nos coupes (Figure 29A-B). Deux étapes primordiales sont effectuées afin de caractériser la myotypologie de chaque biopsie musculaire : l'identification de chaque fibre musculaire à un type de myosines spécifique ; et l'identification des fibres co-exprimant plusieurs types de myosines (Figure 29).

Les surfaces des fibres musculaires étaient calculées de manière automatique grâce à l'immunomarquage généré par l'anticorps anti-laminine (Figure 29C) à l'aide du logiciel ImageJ®. Ceci a fait l'objet de la rédaction d'un protocole utile à l'ensemble du laboratoire (Annexe 9). Toutes les fibres de chaque coupe musculaire étaient comptées. Cela représentait environ 300 fibres en moyenne par coupe.

L'image originale (Figure 29C) est utilisée pour le calcul automatique de l'aire de section des fibres musculaires. Ceci permet de générer des « régions d'intérêt spécifiques » relatives à chaque fibre musculaire après un traitement spécifique de l'image originale (Figure 29D). De cette manière, chaque fibre est associée à un numéro correspondant, à une surface de section (cf. Annexe 5 – Page 299 pour plus de détails).

Le logiciel a la capacité de transposer et de copier les « régions d'intérêts spécifique » d'une image à l'autre. Dans le cas de coupes sériées, les « régions d'intérêts spécifiques » se trouvent exactement au même endroit. De cette manière, les « régions d'intérêts spécifiques » obtenues sur la figure 28 sont projetées sur les figures 28E et 28F sans le marquage anti-laminine. Après avoir enlevé les zones inutiles, on obtient alors les figures 28E et 28F. Ces deux figures possèdent donc les « régions d'intérêts spécifique » et relatives à l'immunomarquage des myosines de type I et de type II exclusivement.

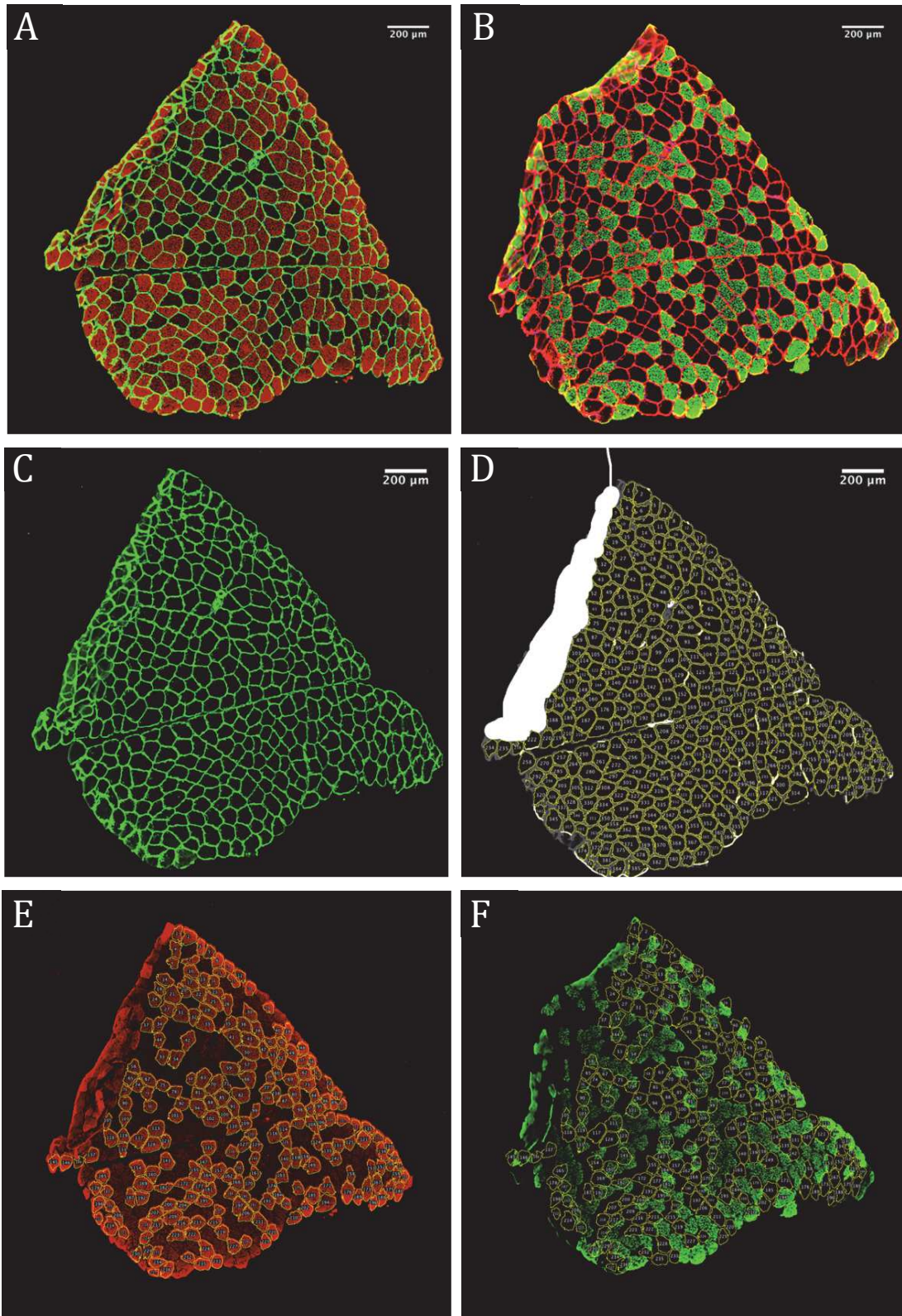


Figure 29 - Représentation immunohistologique des différentes étapes du protocole technique pour identifier l'aire de section des fibres musculaires

Images histologique représentant le marquage des fibres lentes en rouge et leurs contours en vert, (A-C). Image histologique représentant le marquage des fibres rapides en vert et leurs contours en rouge (B). Identification des fibres musculaires avec le protocole spécifique (D). Identification des fibres musculaires sur l'immunomarquage des fibres lentes (E) et des fibres rapides (F).

6.2.3. Identification spécifique des fibres exprimant plusieurs types de myosines

D'après la littérature, il apparaît que les muscles striés squelettiques humains n'expriment que des myosines de type I, IIa ou IIx. Comme décrit précédemment, le déconditionnement musculaire se caractérise par une apparition non seulement de fibres exprimant la myosine de type IIx, mais aussi co-exprimant ce type de myosine en plus de la myosine principalement exprimée. De cette manière, une fibre musculaire peut exprimer une association de plusieurs myosines : I/IIa, I/IIx, IIa/IIx.

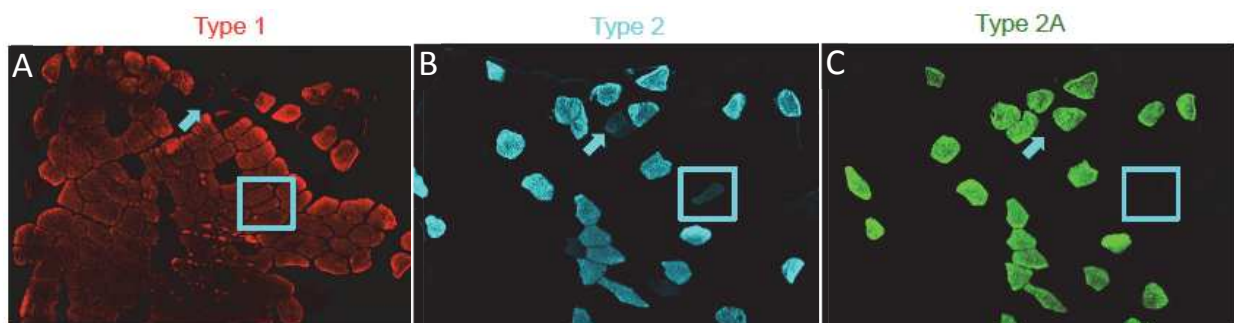


Figure 30 - Identification des fibres dites hybrides co-exprimant de plusieurs isoformes de myosines.

A l'aide de coupes sériées et d'immunomarquages spécifiques, les fibres hybrides sont identifiées. Concernant la fibre encadrée, elle se trouve marquée par l'isoforme de type I, marquée par l'isoforme de type II, mais non marquée par l'isoforme de type IIa. De fait, cette fibre musculaire est de type I/IIx. Concernant la fibre fléchée, elle se trouve non marquée par l'isoforme de type I, marquée par l'isoforme de type II, et non marquée par l'isoforme de type IIa. De fait cette fibre musculaire est de type IIx.

Comme illustré ci-dessus (Figure 30) avec 3 coupes sériées marquées avec les anticorps anti-myosines de type I, de type II et de type IIa nous pouvons ainsi établir le profil de chaque fibre musculaire présente sur cette zone de coupe. Plus précisément, on observe deux zones clairement identifiées par un carré et une flèche.

Si l'on se penche sur la fibre pointée par la flèche, on s'aperçoit que cette fibre n'exprime pas de myosine de type I ; exprime faiblement une isoforme du type 2 ; mais n'exprime pas l'isoforme de myosine de type IIa. Par déduction, cette fibre spécifique est de type IIx. De même pour la fibre encadrée, on s'aperçoit qu'elle exprime deux types de myosines : le type I et le type IIx. Elle est donc appelée fibre musculaire hybride. Cette méthodologie d'identification a été réalisée concernant toutes les fibres musculaires identifiées.

6.2.4. Réalignement des coupes immunohistologiques

L'identification de cette fibre hybride est renforcée par le réalignement des coupes sériées effectuées. En effet, grâce au logiciel (AutoAligner-v.64), nous avons pu superposer les différentes coupes immunohistologiques afin de confirmer l'identification de ces fibres spécifiques effectuée avec ImageJ. Ainsi comme le démontre la

Figure 31 ci-dessous, on s'aperçoit que les coupes sériées se réalignent parfaitement bien, permettant ainsi une rigueur supplémentaire à l'identification des fibres spécifiques.

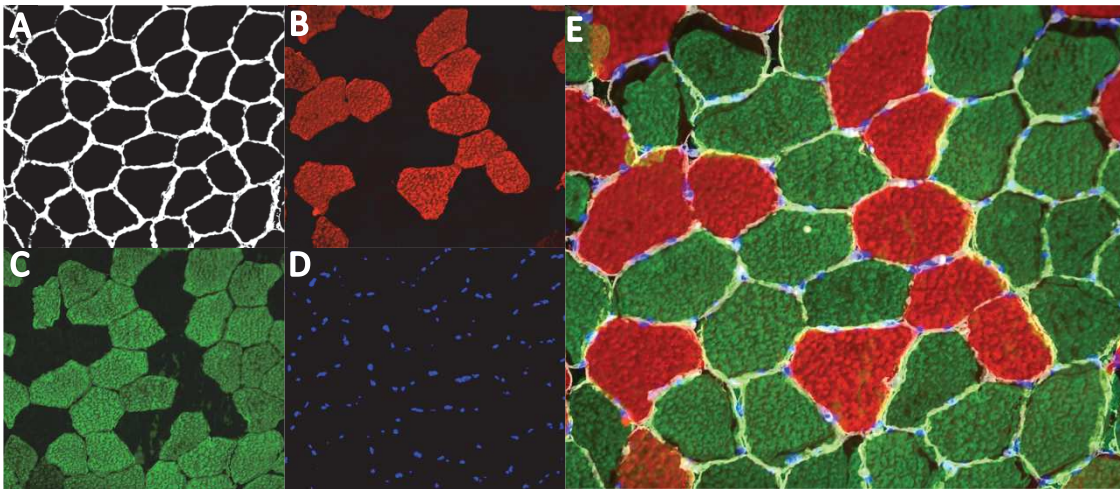


Figure 31 – Superposition de coupes sériées immunohistologiques

A : Image histologique de l'anti-laminine (blanc) entourant chaque fibre musculaire (noir). B : Image histologique représentant les fibres musculaires de type I (rouge). C : Image histologique représentant les fibres musculaires de type II (vert). D : image histologique représentant les noyaux (bleu). E : Superposition des images histologiques A-B-C et D.

6.3. Analyse par western blots de l'expression des protéines d'intérêt

6.3.1. Extraction et quantification des protéines

Pour procéder à l'extraction protéique, une partie de la biopsie musculaire issue du Vastus Lateralis a été broyée mécaniquement au potter dans un tampon de lyse (1/10 masse/volume ; 50mM Tris pH 7.5, 150mM NaCl, 1mM EGTA, 1mM EDTA, 1% Triton x-100, 100mM NaF, 5mM Na₃VO₄, 40mM β-glycérophosphate, 1% SDS, et d'un cocktail d'inhibiteurs de protéases). L'homogénat a été ensuite centrifugé à 4°C pendant 10 minutes à 10000g, puis le surnageant a été récupéré. Les protéines totales des échantillons ont été quantifiées avec la méthode BCA (BiCinchoninic acid Assay).

Les protéines ont ensuite été dénaturées en présence de tampon Laemmly (composition 5x : 250mM de Tris Base pH 6,8, 10% SDS, 25% β -mercaptoéthanol, 0,1% de bromophenol blue et 50% de glycérol) puis séparées par migration par électrophorèse (80 à 200V) sur un gel à gradient de polyacrylamide en conditions dénaturantes (Mini-PROTEAN TGX Stain-Free Precast Gels 4-20%, Biorad). Les protéines ont ensuite été transférées grâce au Trans-Blot Turbo Transfer System (Biorad) depuis le gel vers la membrane de nitrocellulose (Format midi 0,2 μ m, Biorad). Après l'étape de transfert, il est essentiel de bloquer les sites d'interactions non spécifiques entre les membranes et les anticorps en incubant pendant 1h à température ambiante les membranes dans une solution de TBS contenant 5% de lait écrémé et 0,1% de Tween 20. Les membranes ont été ensuite incubées à 4°C toute la nuit sous agitation avec des anticorps primaires (Tableau 4).

Anticorps	Référence	Dilution	Fournisseur	Anticorps	Référence	Dilution	Fournisseur
4E-BP1-p	2855		CeSig	MuRF-1	sc-27642	1/500	Santa Cruz
4E-BP1-t	9644		CeSig	P38-p	#9211	1/500	CeSig
Akt ser ⁴⁷³	#4060	1/1000	CeSig	P38-t	#9212	1/500	CeSig
Akt total	#9272	1/1000	CeSig	P70S6K			
AMPK	#2535	1/500	CeSig	PDGFR α	#3174	1/500	CeSig
Atrogin-1	AP2041	1/250	Biosciences	Pérlipine	#9349	1/500	CeSig
C/EBP β	Sc-150	1/200	Santa Cruz	PGC1 α	AB3242	1/1000	Millipore
C/EBP α	#8178	1/500	CeSig	PPAR γ	Sc-7273	1/200	Santa cruz
Cit. Synthase	GTX110624	1/500	Gentex	Rabbit	sc-2005	1/4000	Santa Cruz
Cox IV	GTX101499	1/500	Gentex	Rabbit	170-6515	1/10000	Biorad
FABP4	#3544	1/500	CeSig	RPS6-p			
Fission-1				RPS6-t	#2317	1/500	CeSig
FoXO3A-p Ser253	#9466	1/500	CeSig	Sirtuin-1	#8469	1/500	CeSig
FoXO3A-t	#2497	1/500	CeSig	Souris (Sec.)	Sc-2005	1/4000	Santa Cruz
Lapin (Sec.)	Sc-2004	1/4000	Santa Cruz	TRIM32	50555	1/500	ABCAM
MFN2	sc-30366	1/200	Santa Cruz	Ubiquitine	sc-8017	1/3000	Santa cruz
Mul-1	AB-84-061	1/500	ABCAM				

Tableau 4 - Liste des anticorps utilisés lors de cette étude

Liste des anticorps primaires et secondaires utilisés. La référence, la dilution ainsi que le fournisseur est indiquée. CeSig : Cell Signaling (Fournisseur).

Enfin après trois rinçages au TBS-Tween, les membranes ont été incubées pendant 1h à température ambiante avec les anticorps secondaires (anti-mouse, anti-rabbit, anti-goat, au 1/4000, Santa Cruz). La révélation des protéines d'intérêt a été réalisée en utilisant un kit ECL

(Pierce) et le ChemiDoc Touch (Biorad, Etats-Unis). Après la récupération des images depuis le ChemiDoc, la quantification des signaux a été effectuée grâce au logiciel ImageLab v.5.2.2 (Biorad, Etats-Unis). Une normalisation des dépôts a été réalisée avec la quantité de protéines totales quantifiable grâce à la technologie « Stain Free » présente sur les gels utilisés.

6.3.2. Quantification de l'expression des ARNm par RT-qPCR

Les ARN totaux ont été isolés à partir d'échantillons de muscles homogénéisés en utilisant le kit RNeasy Fibrous Tissue Mini selon les instructions du fabricant (Qiagen). La concentration d'ARN a été déterminée par analyse spectrophotométrique (Eppendorf AG, Hambourg, Allemagne), et l'intégrité a été vérifiée par le rapport d'absorption OD260nm / OD280nm (> 1.7). La réaction de transcription inverse a été effectuée avec 2 ug d'ARN total en utilisant le kit de synthèse d'ADNc RevertAid First Strand (Thermo Scientific) selon les instructions du fabricant. L'analyse de qPCR a été effectuée dans un système de détection MiniOpticon (Bio-Rad, Hercules, CA) avec 10µL de KAPA SYBR Fast Universal Readymix (CliniSciences), 300nM d'amorces sens et anti-sens, 2µL de matrice d'ADNc dilué et de l'eau à un volume final de 20µL. Les amorces avant et inverses utilisées pour amplifier les gènes sont listées dans le Tableau 5 ci-après.

Gène	Forward (sens)	Reverse (anti-sens)	Taille de l'amplicon (pb)
C/EBP α	GACCAGAAAGCTGAGTTGTGAG	CCACAAAGCCCAGAAACCTA	69 pb
C/EBP β	CTCCAGGTAGGGGCTGAAGT	TTTAGACCCATGGAAGTGCC	150 pb
Cyclophilin A	TTCCTCCTTTCACAGAATTATTCCA	CCGCCAGTGCCATTATGG	75 pb
PDGFR α	AAGACCTGGGCAAGAGGAAC	GAACCTGTCTCGATGGCACT	67 pb
PPAR γ	GTGCCAGTTTCGATCCGTAGA	GGCCAGCATCGTGTAGATGA	142 pb
rpS9	CGGCCCGGGAGCTGTTGACG	CTGCTTGCGGACCCTAATGT	247 pb

Tableau 5 - Liste des amorces utilisées en RT-qPCR lors de l'expérience d'immersion sèche

Toutes les qPCR ont été réalisées en dupliquât selon les paramètres du cycle suivants: 30s à 98 ° C, 40 cycles de 1s à 95 ° C et 15s à 60 ° C. Les niveaux d'ARNm relatifs ont été normalisés par rapport à la protéine ribosomale S9 (rpS9) ou au gène de ménage cyclophiline A, qui n'ont pas été affectés par les traitements. Les résultats sont exprimés en utilisant le seuil de cycle comparatif (CT). Les modifications relatives du niveau d'un gène spécifique ont été calculées avec la formule $\Delta\Delta CT$.

6.4. Analyse du transcriptome par RNA-seq

6.4.1. Définition de la technique « RNA-seq »

Le terme « RNA-Seq » vient de l'anglais « RNA sequencing » et signifie « séquençage de l'ARN ». Il est également parfois nommé séquençage aléatoire du transcriptome. Cette technologie utilise le séquençage à haut débit pour identifier et quantifier l'ARN issu de la transcription du génome à un moment donné. Dans notre étude, nous avons caractérisé le transcriptome avant et après l'immersion sèche de 3 jours sur chaque sujet.

Les technologies de séquençage à haut débit ont permis la lecture de l'ADN d'une cellule, base par base. Ces technologies permettent également la lecture de l'ARN dans une cellule, ce qui facilite la compréhension des mécanismes d'épissage alternatif de gènes, comprenant les modifications post-transcriptionnelles, les gènes de fusion, les polymorphismes nucléotidiques (*SNP* en anglais) et les changements dans l'expression génique. En plus de l'ARNm, la technologie RNA-Seq permet d'identifier d'autres types d'ARN, tels que les microARN (*miRNA* en anglais), l'acide ribonucléique de transfert (ARNt, *tRNA* en anglais) et l'ARN ribosomal (ARNr, *rRNA* anglais). La technologie du RNA-Seq est utile pour déterminer les marges exon/intron des gènes et pour vérifier la localisation des extrémités 5' et 3' annotées antérieurement. Les études réalisées avec la technologie RNA-Seq comprennent l'observation des changements qui se produisent dans une cellule au cours d'infections et des changements dans l'expression génique pour les études portant généralement sur le cancer et autres pathologies.

Avant l'arrivée des technologies de séquençage à haut débit, les études de masse portant sur l'expression des gènes étaient principalement réalisées par le biais de la technologie des puces à ADN.

6.4.2. Méthodes utilisées pour l'analyse RNA-seq

À partir de l'extraction d'ARN effectuée au laboratoire, nous avons envoyé les échantillons de chaque sujet sur une plateforme d'analyse et de traitement à Nice. Cette collaboration nous a permis d'obtenir les résultats ci-après. Nous tenons particulièrement à remercier l'équipe de l'IPMC de Nice qui a travaillé avec nous sur ce projet.

La normalisation des échantillons et l'analyse différentielle des expressions a été effectuée avec le logiciel R© d'après le packaging DESeq2. Pour chaque échantillon, il a été calculé la valeur *baseMean*. Cette valeur correspond à la moyenne propre de chaque gène compté et identifié au sein de l'échantillon. Afin d'éviter des biais d'analyse, la limite basse moyenne (*CutOff*) a été fixée à une valeur de 100. En dessous de cette valeur, les valeurs d'expressions géniques ont été considérées comme non significatives. Pour exprimer le ratio des changements d'expressions géniques entre la condition Pré- et Post-DI, nous avons utilisé le logarithme en base 2 (Log_2). Ainsi une valeur obtenue supérieure à 1 correspond à une augmentation de l'expression d'un gène particulier entre la condition Pré et Post. L'expression de ce gène est donc up-régulée avec l'immersion sèche. À l'inverse, une valeur du ratio obtenue inférieure à 1 correspond à une diminution de l'expression d'un gène particulier entre la condition Pré et Post. L'expression de ce gène est donc down-régulée avec l'immersion sèche. Cette technique d'exprimer ces changements en Log_2 permet d'apporter plus de clarté et de simplicité lorsque des gènes subissent de fortes augmentations et diminutions.

A titre d'exemple, un ratio de 10 en Log_2 correspond à augmentation réelle de l'expression du gène d'un facteur 1000. A l'inverse, un ratio de 0.3 en Log_2 correspond à une diminution réelle de l'expression du gène d'un facteur 1.7 environ. Cette technique permet « d'écraser » les différences d'expressions afin de les rendre plus abordables. Le graphique ci-après (Figure 32) permet de se rendre compte que les valeurs sont « écrasées » malgré d'importants changements.

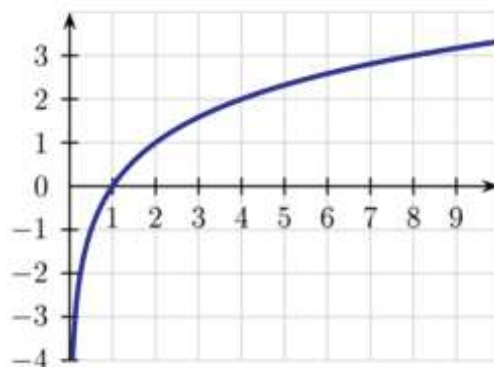


Figure 32 - Représentation du logarithme binaire

Graphique mathématique représentant la courbe du logarithme binaire. Par exemple, on observe qu'un changement d'expression doublé correspond à \log_2 égal à 1.

Ainsi, pour notre analyse, nous avons décidé d'étudier tous les gènes dont l'expression était significativement régulée. Cela signifie que la significativité du test de Wald concernant la distribution de l'expression de chaque gène en fonction de la condition pré et post était significative ($p\text{-value} < 0.05$). Ainsi nous nous sommes intéressés uniquement aux gènes dont les différences d'expression étaient significatives avec le paramètre *baseMean* supérieur à 100.

6.4.3. Liste des gènes dont les changements sont les plus importants

En se basant sur les deux paramètres précédents ; $baseMean < 100$ & $p\text{-value} < 0.05$; nous avons obtenus la liste ci-après correspondant aux changements d'expressions, augmentation ou diminution, les plus significatifs (Tableau 6).

Symbole	Définition du gène	<i>baseMean</i>	<i>Log₂ FoldChange</i>	Facteur de changement	<i>p-value</i>
MYL12A	Myosin light chain 12A	28261	-1.73	x0.3	3.23E ⁻³⁸
MYADM	myeloid associated differentiation marker	351	-1.11	x0.46	7.95E ⁻³⁸
FAM212B	family with sequence similarity 212 member B	886	1.51	x2.85	1.42E ⁻³⁵
ANXA3	Annexin A3	268	-1.09	x0.47	6.67E ⁻³¹
DNAJA4	DnaJ heat shock protein family	2859	-1.13	x0.46	1.02E ⁻²⁹
PLXNA4	Plexin A4	101	-1.34	x0.39	6.78E ⁻²⁹
IGFBP5	insulin like growth factor binding protein 5	19597	1.20	x2.3	2.03E ⁻²⁶
ARNTL	aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator like	517	1.20	x2.3	4.88E ⁻²²
ACTA2	Actin alpha 2	803	-1.47	x0.36	1.32E ⁻²¹
ENG	Endoglin	918	-1.06	x0.48	3.20E ⁻²¹

Tableau 6 - Liste des gènes dont les changements d'expression sont les plus significatifs.

6.4.4. Les logiciels dédiés à l'analyse RNA-seq

Cette technique très novatrice, utilisée dans le monde de la médecine, des pathologies et des cancers possède de nombreux logiciels d'analyses et de traitement de données. C'est pourquoi, la collaboration scientifique avec l'équipe de Nice a permis d'utiliser le logiciel IPA (*Ingenuity Pathway Analysis* – Qiagen Bioinformatics).

A partir de la liste de tous les gènes dont les changements d'expression apparaissaient significatifs ($p\text{-value} < 0.05$) et l'expression moyenne suffisante ($baseMean < 100$), nous avons pu extraire quelques représentations de voies de signalisation impactées par

l'immersion sèche. GenePattern est un logiciel gratuit qui répond à ce problème en fournissant plus de 100 outils d'analyses et de visualisations pour la recherche génomique dans un environnement convivial et complet pour les utilisateurs à tous les niveaux d'expérience en informatique. Il permet d'accéder à une large gamme de méthodes de calcul utilisées pour analyser les données génomiques. Il permet aux chercheurs d'analyser les données et d'examiner les résultats sans écrire de programmes ou demander de l'aide à des collègues informatiques. Plus important encore, GenePattern assure la reproductibilité des méthodes d'analyse et des résultats en capturant la provenance des données et des méthodes analytiques, l'ordre dans lequel les méthodes ont été appliquées et tous les paramètres.

6.5. Modélisation de la force maximale volontaire isométrique

La contraction volontaire isométrique maximale (MVC) a été évaluée pour les extenseurs du genou. Le test a été effectué avant et après le protocole d'immersion sèche à l'aide d'un dispositif ConTrex®. Une séance de familiarisation a été effectuée avant la première mesure pour habituer les bénévoles à l'équipement et à la procédure du test. Pour tous les tests, le membre dominant a été testé. Le sujet, en position assise, était fermement attaché à la chaise d'examen lorsque la MVC isométrique était testée. Le protocole de test était le suivant: après une courte phase d'échauffement en position neutre, il est demandé au sujet d'effectuer trois extensions maximales, chaque contraction ayant une durée de 5 à 7 secondes. Une période de repos de deux minutes a été respectée entre les séries successives de trois contractions. La durée totale du test de MVC isométrique était de 15 minutes. Ces données, acquises pendant une période de 30 secondes entourant chaque contraction, ont été séquencées en phases distinctes. La première phase représentait une période de repos de 7-8 s, force nulle. Les données individuelles brutes échantillonnées à une fréquence de 256 Hz ont été ajustées à l'aide de la fonction mono-exponentielle (voir ci-après, équation 3, page 78) pour les phases de montée en force et de relaxation (Figure 33).

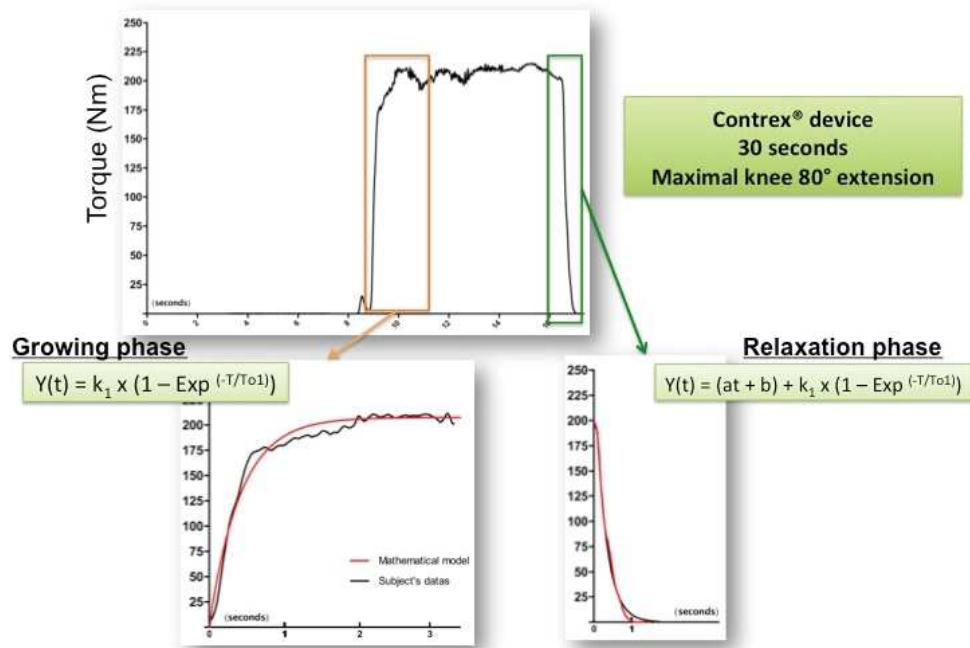


Figure 33 – Méthode de modélisation des tests de force maximale volontaire isométrique

À partir du signal brut obtenu du Contrex®, nous avons modélisé le signal encadré en orange et en vert ; respectivement la phase de montée en force et la phase de relaxation, selon les équations relatives décrites ci-dessus. Le signal rouge correspond à la modélisation du signal extrait de ces deux phases.

Les paramètres mesurés étaient le couple isométrique maximal pour l'extension (MVC, Nm), le couple maximal normalisé par la section transversale du quadriceps (norm-MVC, Nm / cm²), le taux de développement de la force (k_{ACT} , s⁻¹) et le taux de relaxation du couple (k_{REL} , s⁻¹). Le temps de relaxation de la force totale était biphasique, en commençant par une phase lente et linéaire (pente de phase lente, k_{LIN} , au), commençant par b (couple de phase de relaxation, Nm) et avec k_1 , correspondant à l'amplitude de la phase mono-exponentielle rapide (non évaluée). TD1 est le point final de la génération de couple et n'a pas été pris en compte. Lorsque la phase linéaire est terminée, une constante de temps (constante TD2, secondes) montre le début d'une phase de relaxation rapide et mono-exponentielle (vitesse de relaxation de force, k_{REL} rapide, s⁻¹). Deux constantes fixes et indépendantes (V et W) ont été utilisées pour distinguer trois phases dépendant du temps. V dépendait de TD1, et W dépendait de TD2. La qualité de l'ajustement a été évaluée en utilisant le coefficient de détermination (R^2) (Figure 34).

$$Y = MVC (1 - e^{-t \times kACT} + V \times (kLIN \times (t - TD1) + b) + W \times (k1 (1 - e^{-(t-TD2)}) \times KREL)) \quad (\text{Equation 3})$$

Avec, *MVC*: contraction volontaire maximale, Nm; *T*: temps, s; *KACT*: constante de temps montée en force, s^{-1} ; *V*: constante indépendante, 0 ou 1; *KLIN*: pente de phase lente; unité arbitraire; *TD1*: constante de temps 1, s; *B*: début de la phase de relaxation du couple, Nm; *W*: constante indépendante, 0 ou 1; *K1*: constante de force, Nm; *TD2*: constante de temps 2, s; *KREL*: constante de temps de relaxation de force, s^{-1}

où:

$V = 0$ et $W = 0$ lorsque $t < TD1$ et $t < TD2$;

$V = 1$ et $W = 0$ lorsque $t > TD1$ et $t < TD2$;

$V = 0$ et $W = 1$ lorsque $t > TD1$ et $t > TD2$.

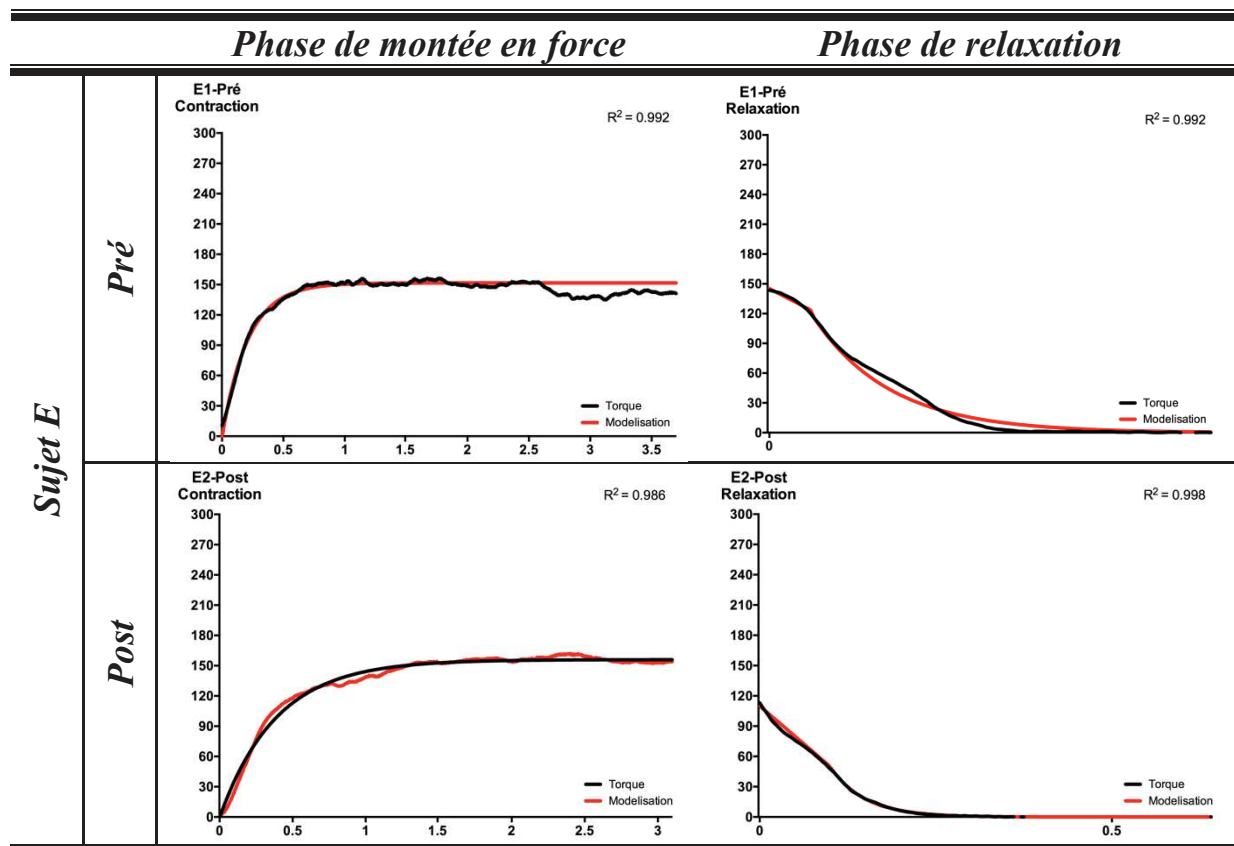


Figure 34 – Modélisations (signal rouge) des tests de contraction maximale volontaire isométrique (signal noir) concernant le sujet E.

Exemples de modélisations sur 3 sujets correspondant à la phase de montée en force et à la phase de relaxation avant et après 3 jours d'immersion sèche. Les coefficients de déterminations sont indiqués en haut à droite. La courbe noire correspond au signal brut de chaque sujet, tandis que la courbe rouge correspond à la modélisation mathématique du signal.

6.6. Analyse par Imagerie à Résonance Magnétique (IRM)

Cette partie du travail a été effectuée en collaboration avec Loic Treffel. Un appareil classique Siemens-Avanto a été utilisé à l'hôpital de Toulouse (CHU Rangueil). Une IRM de contrôle a été effectuée 4 jours avant le début de l'expérimentation. Au troisième jour de l'immersion sèche (DI3), les sujets ont été transférés dans la salle d'IRM toujours dans un lit incliné à -6° vers la tête afin de préserver autant que possible les effets de l'impesanteur simulée. Le contenu graisseux du quadriceps (T1 Dixon Axial Water / Fat concentration) a été mesuré aux mêmes points de repères, notés lors de l'analyse par IRM avec une "marque", qui a été utilisée comme référence pour le placement du champ magnétique (FoV: 240 mm; TR: 6,98 ms; TE: 2,38 ms; épaisseur de section: 5 mm; 30 tranches; 560 Hz / Px). Cette marque se situe exactement à mi-chemin entre la crête iliaque antérieure et la partie supérieure de la rotule ipsilatérale (gauche). Les mesures ont été prises sur le côté gauche en raison de la biopsie sur le côté droit. Cette condition a été choisie pour éviter d'induire des signaux hétérogènes dans l'analyse IRM du site de biopsie.

La surface et la teneur en matières grasses ont été calculées par le logiciel OsiriX MD (v.7.0.1, logiciel 64 bits). Le même expérimentateur a interprété les données avant et après la DI. L'IRM Dixon à trois points a été utilisée pour mesurer la teneur en graisse intramusculaire (IFC) en pourcentage dans le compartiment musculaire antérieur des images (Kovanlikaya, Guclu, *et al.*, 2005; Kovanlikaya, Panigrahy, *et al.*, 2005). La valeur a été calculée avec la moyenne de trois mesures dans les deux séquences T1 Axial Dixon W / F en utilisant: $IFC (\%) = (F / W) \times 100$. La surface du compartiment antérieur de la cuisse et de l'IFC a été mesurée dans la même région d'intérêt (ROI) sur les images centrées sur le même repère (figure 6). Chaque paramètre a été mesuré en trois tranches, l'une centrée sur le point de repère, l'une au-dessus du marquage, et l'autre ci-dessous. Les mesures ont été répétées jusqu'à ce que l'accord atteigne le seuil de 3% et les valeurs ont été calculées en moyenne, comme l'ont décrit Belavy et collaborateurs en 2013 (Belavy *et al.*, 2013).

6.7. Analyse des propriétés viscoélastique du Rectus Femoris avec le MyotonPro©

Cette partie a également été effectuée en collaboration avec Loic Treffel. Les caractéristiques mécaniques du muscle du rectus femoris ont été déterminées au repos à l'aide d'un myomètre à main (MyotonPRO, Myoton Ltd, Estonie) un jour avant DI, le jour 1 et le jour 3 de la

période DI et un jour après DI. La fiabilité de l'utilisation du myomètre a été validée sur les muscles des membres inférieurs pendant le vol parabolique (Schneider *et al.*, 2015) (Schneider *et al.*, 2015) et sur la mâchoire et les muscles cervicaux pendant DI (L. Treffel, Dmitrieva, *et al.*, 2016). À l'aide de ce myomètre, la réponse viscoélastique du muscle a été évaluée en appliquant une impulsion mécanique brève (15 ms et de force = 0,4 N) sur la surface de la peau au-dessus du muscle. La déformation mécanique a été délivrée par l'extrémité de test de l'appareil (d = 3 mm), perpendiculaire à la surface de la peau. Un capteur d'accélération numérique à 3 axes intégré a enregistré l'oscillation musculaire sous la forme d'une courbe d'accélération. Si une courbe ne satisfaisait pas aux paramètres de mesure, un message d'erreur a averti l'expérimentateur afin de répéter les essais.

L'appareil a été utilisé en mode multiscan, dans lequel une mesure correspondait à la moyenne de 5 mesures mécaniques avec un coefficient de variation inférieur à 3% pour valider chaque mesure. Les procédures ont été rapportées dans la littérature (Aird, Samuel, & Stokes, 2012; Chuang, Wu, & Lin, 2012; Dietsch *et al.*, 2014). Ces études ont démontré la validité et la fiabilité des mesures du Myoton dans les membres, le tronc et la musculature orofaciale. En outre, des études récentes (Agyapong-Badu *et al.*, 2013; Pruyn, Watsford, & Murphy, 2015) ont révélé une excellente fiabilité interrécursive avec une corrélation interclasse de 0,81-0,98 sur le rectus femoris. À partir du signal d'accélération de l'oscillation, nous avons étudié trois paramètres calculés en temps réel par le logiciel MyotonPRO: rigidité dynamique, fréquence d'oscillation et décroissance logarithmique. La rigidité dynamique caractérise la résistance du muscle à une force externe qui déforme sa forme initiale. Ce paramètre a été calculé comme suit: $Rigidité = m \times a_{max} / \Delta l$, où m est la masse de l'extrémité d'essai du myomètre (kg), a_{max} est l'accélération maximale de l'oscillation (m / s^2), et Δl est la profondeur de déformation de la masse musculaire (Gavronski *et al.*, 2007), avec une fiabilité / précision de 3,9%. La fréquence d'oscillation, qui caractérise le tonus musculaire ou la tension intrinsèque dans un muscle détendu, était la suivante: $f = 1 / T$ [Hz], où T désigne la période d'oscillation en secondes avec une précision de 1,1%. La décroissance logarithmique de l'oscillation naturelle d'un muscle renseigne sur l'élasticité du muscle.

L'élasticité est la propriété biomécanique d'un muscle qui caractérise la capacité de récupérer sa forme initiale après une contraction ou un retrait d'une force externe. L'élasticité est inversement proportionnelle à la décroissance. En théorie, un décrement de 0 (Casolino *et*

al.) représente une élasticité absolue. Il a été mesuré avec une fiabilité de 1,5% (certificat d'essai n ° 2-034-11 en 09-09-2011).

Au cours des tests, le sujet se trouvait dans une position allongée. Une mesure unilatérale a été prise sur le muscle du rectus femoris gauche dans une position de repos complète afin de mesurer les propriétés musculaires relaxées. L'extrémité d'essai a été placée perpendiculairement à la surface de la partie médiane du rectus femoris. Les repères anatomiques ont été marqués avec un stylo à la distance moyenne entre la colonne vertébrale iliaque supérieure antérieure et la partie supérieure de la rotule. Toutes les mesures ont été prises sur le même point musculaire.

7. Statistiques

En raison des différentes expérimentations menées mais aussi de divers problèmes techniques, certaines analyses n'incluent pas les données de tous les sujets. En effet, l'expérience d'immersion sèche comporte ainsi 12 sujets, la pré-évaluation d'une contremesure avec un protocole de réduction d'activité comporte 20 sujets, et enfin la première session d'alitement prolongé de 60 jours comporte 10 sujets. Pour chaque expérience, le nombre de sujets (N) a été indiqué dans chaque légende respective.

La normalité de chaque échantillon a été évaluée avec le test de normalité Shapiro-Wilk. Les valeurs sont exprimées en moyenne, moyenne \pm SD ou moyenne \pm SEM en fonction de la représentation choisie. Lorsque la normalité était respectée, un Test-T de Student pour échantillons appariés a été utilisé. Lorsque les données n'étaient pas normalement distribuées, le test classé par rangs de Wilcoxon a été utilisé pour comparer les changements entre pré et post-DI. Une ANOVA à un facteur à mesures répétées a été utilisée pour analyser les paramètres de tonus musculaires en pré et post-DI lorsque les données mesurées étaient normales. Lorsque les données mesurées n'assumaient pas la normalité, une ANOVA de Friedman a alors été utilisée. Dans le cas où les échantillons n'étaient pas appariés, le test de Kruskal-Wallis a été utilisé. La sphéricité de chaque échantillon a été vérifiée avec le test de Mauchly. Les tests post hoc ont été effectués avec le test de Dunn lorsque des effets principaux importants ou des interactions ont été trouvés ($P < 0,05$). Les tests post hoc ont été effectués avec le test de Dunn lorsqu'un effet principal ou une interaction significative a été trouvé ($P < 0,05$), sinon un simple test-T de Student pour échantillons appariés a été effectué selon la normalité des échantillons.

Le test du Khi-deux (χ^2) permettant de tester l'adéquation de deux séries de données a été utilisé pour déterminer si les différences entre les échantillons pré et post-DI étaient significatives. Un test t apparié ou le test de Wilcoxon a été utilisé pour déterminer s'il y avait une différence entre pré et post-DI sur un intervalle précis. Le seuil de significativité a été fixé à 5% ($P < 0,05$) pour toutes les comparaisons. Toutes les analyses, et graphiques ont été réalisées avec GraphPad Prism 6.

8. Résultats de l'étude d'immersion sèche de 3 jours

8.1. Une perte rapide du poids de corps après seulement 3 jours de DI

Il est primordial de noter que tous les sujets de l'étude ont effectué le protocole expérimental dans sa globalité ainsi que toutes les expérimentations souhaitées par les équipes scientifiques du projet. De manière globale, il a été retrouvé une diminution globale et significative de 1,6% du poids de corps des sujets après seulement 3 jours d'immersion sèche (de $74,5\text{kg} \pm 7,2\text{kg}$ à $73,2\text{kg} \pm 6,9\text{kg}$, $N=12$, $P < 0,001$). Ainsi de manière évidente et logique, l'indice de masse corporelle des sujets de l'étude a également diminué de façon significative (Tableau 7).

Sujets	Age (ans)	Taille (cm)	Poids de corps (kg)		Indice de masse corporel	
			Pre	Post	Pre	Post
A	39	167	66.6	66.0	23.9	23.7
B	39	183	86.2	84.9	25.7	25.4
C	34	172	77.9	75.6	26.3	25.6
D	36	183	71.7	70.0	21.4	20.9
E	33	184	73.5	72.3	21.7	21.4
F	26	174	72.1	71.1	23.8	23.5
G	30	174	66.7	65.2	22.0	21.5
H	28	182	80.8	78.9	24.4	23.8
I	34	189	86.1	84.8	24.1	23.7
J	26	178	68.8	68.7	21.7	21.7
K	30	180	77.0	75.8	23.8	23.4
L	26	169	66.2	65.8	23.2	23.0
Moyenne	32 ± 5	178 ± 7	74.5 ± 7.2	73.2 ± 6.9***	23.5 ± 1.6	23.1 ± 1.5***

Tableau 7 - Données anthropométriques des sujets avant et après 3 jours d'immersion sèche.

*Age, taille, poids de corps, et indice de masse corporel avant et après 3 jours d'immersion sèche. Les données représentées sont les moyennes ± écarts-types). N=12. *** Significativement différent des valeurs Pre-DI ($P < 0.001$).*

8.2. Changements structuraux du *Vastus Lateralis* après 3 jours d'immersion sèche

8.2.1. Une atrophie musculaire objectivée

L'aire de section des fibres musculaire a été mesurée par analyse morphométrique des coupes cryostat effectuées, immunomarquées avec l'anticorps anti-laminine issus des échantillons de biopsies musculaires du *Vastus Lateralis* pré et post-DI relatifs aux différents sujets composant l'étude (Figure 35).

De façon globale, l'analyse morphométrique réalisée sur l'ensemble des fibres musculaires des sujets démontre une atrophie de l'aire de section des fibres musculaires de 10,6% ($p < 0.05$) après 3 jours d'immersion sèche (Figure 35A). L'illustration en Figure 35B représente cette atrophie musculaire significative après seulement 3 jours d'impesanteur simulée.

Une analyse morphométrique détaillée montre un déplacement vers la gauche de la distribution de la taille des fibres (Figure 35C, $\chi^2 = 6,925$; $P = 0,008$). Ceci met donc en évidence la proportion accrue de fibres avec des aires de section plus petites (Figure 34B). Cette augmentation a été améliorée pour les aires de section de fibres inférieures à $2000 \mu\text{m}^2$ et inférieures à $2500 \mu\text{m}^2$ (respectivement, $P = 0,039$ et $P = 0,027$).

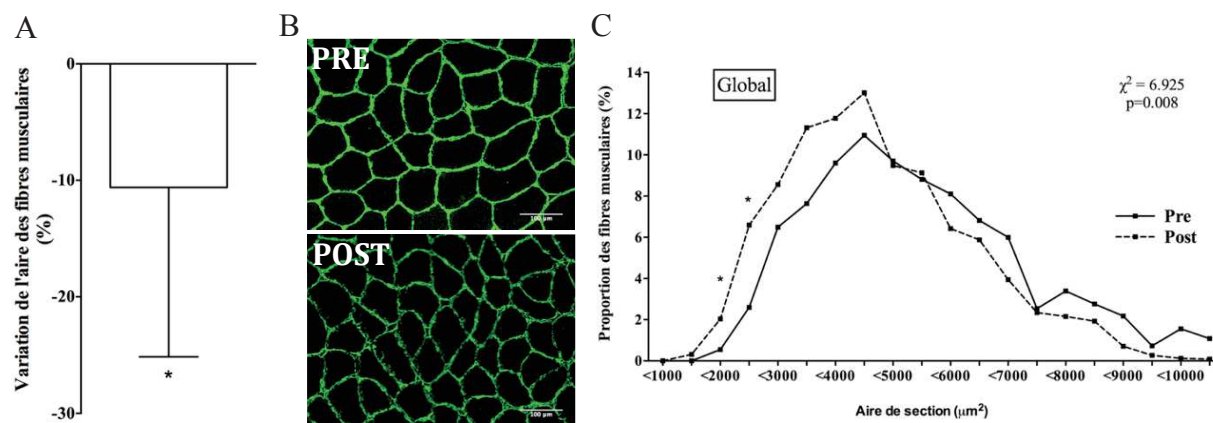


Figure 35 - Effet de 3 jours d'immersion sèche sur le degré d'atrophie global

A : Variation globale (%) de l'aire de section des fibres musculaires après 3 jours d'immersion sèche (Post vs. Pre). *B* : représentation immunohistologiques de fibres musculaires marquées avec l'anticorps Anti-Laminine avant et après 3 jours d'immersion sèche. Échelle = $100 \mu\text{m}$. *C* : Distribution des fibres musculaires avant (Pre, trait plein) et après (Post, trait pointillé) 3 jours d'immersion sèche.

8.2.2. Changements myotypologiques après 3 jours d'immersion sèche

L'analyse de l'aire de section des fibres musculaires liée au type de fibre a montré une atrophie significative des fibres musculaires lentes dites de type I (-10,6% ± 12,1), pré: 6540 ± 1321 μm² avant post: 5846 ± 1068 μm²; P = 0,027, Figure 36B). Par ailleurs, nous n'observons aucune modification significative de l'aire de section des autres types de fibres, hybrides ou non.

Nos résultats ont également rapporté des changements significatifs dans la myotypologie après 3 jours de DI, ce qui se traduit par une diminution significative de la proportion de fibres de type IIA (49,8% ± 9,1 % à 36,1% ± 14,5 %, P = 0,049).

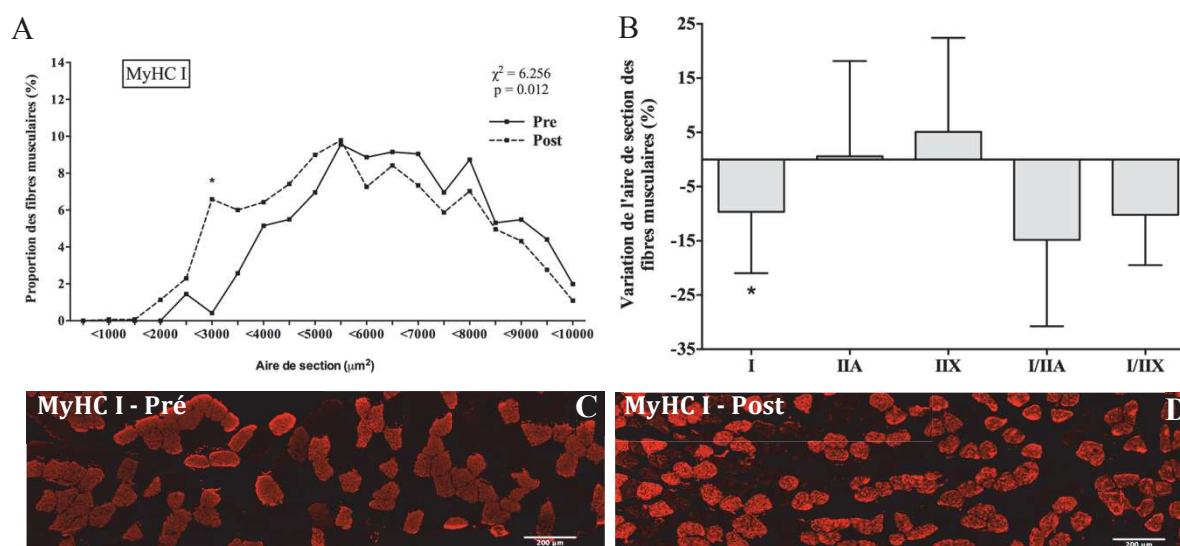


Figure 36 - Effet de 3 jours d'immersion sèche sur les fibres de type oxydatif

A : Distribution des fibres musculaires de type I avant (Pre, trait plein) et après (Post, trait pointillé) 3 jours d'immersion sèche (N=8). **B** : Variations (%) de l'aire de section des fibres de chaque type en condition Post vs. Pre; **C-D** : Marquage immunohistochimique des MHC I avant et après 3 jours d'immersion sèche. Échelle : 200 μm. * P < 0.05 ; **P < 0,01: significativement différent de la moyenne Pre.

Selon la Figure 35, on s'aperçoit que le décalage global vers la gauche indiquant des fibres de plus petite taille après ces 3 jours d'immersion sèche est sensiblement retrouvé sur cette même représentation pour les fibres de types I (Figure 36). Ce décalage vers la gauche serait attribuable uniquement à l'aire de section des fibres de type I ($\chi^2 = 6.256$, P = 0.012, Figure 36), ce qui souligne à nouveau l'atrophie préférentielle des fibres musculaires à contraction lente.

8.2.3. Apparition précoce de co-expression de différents types de myosines dans les fibres musculaires

En utilisant la méthode d'analyse décrite et illustrée précédemment, on observe une augmentation de la proportion des fibres co-exprimant deux isoformes de chaînes lourdes de myosines, appelées fibres hybrides (Figure 37B-C-D). En effet, on observe une augmentation des fibres exprimant à la fois la myosine de type I et la myosine de type IIX. Cette augmentation significative correspond à $0,34 \% \pm 0,43 \%$ de co-expression avant l'immersion sèche, à $1,30 \% \pm 1,38 \%$, ($P = 0,046$) (Figure 37A).

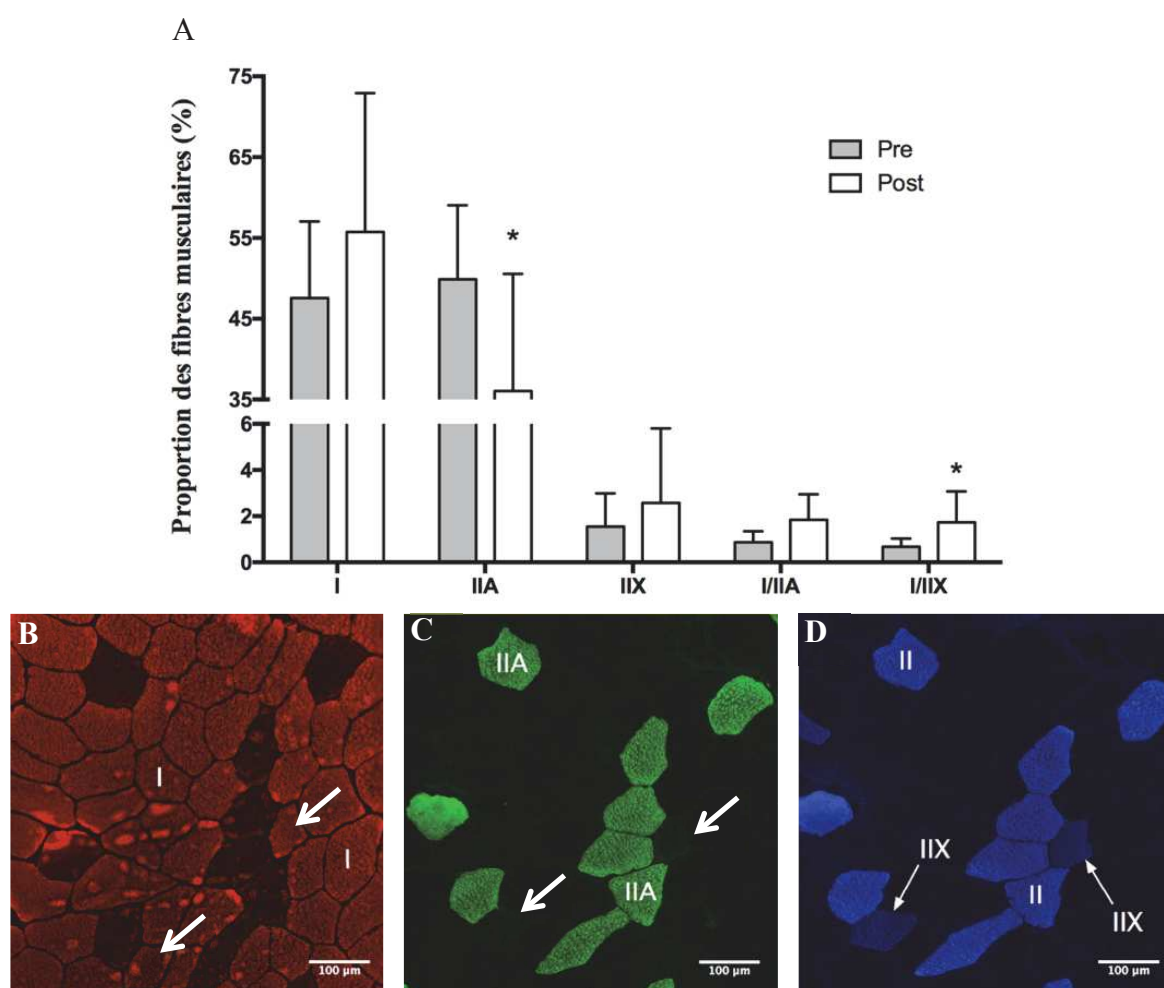


Figure 37 – Changements myotypologiques après 3 jours d'immersion sèche : apparition de fibres musculaires dites hybrides

A, Proportion (%) des fibres musculaires en fonction de leurs types en condition Pre- et Post-DI. *B*, Marquage immunohistologique des fibres de type MyHC I à la fin des 3 jours d'immersion sèche. Échelle: 100 μm . *C*, Marquage des fibres de type MyHC IIA (vert) à la fin des 3 jours d'immersion sèche. Échelle: 100 μm . *D*, Marquage des fibres de type MyHC II (bleu) à la fin des 3 jours d'immersion sèche. Échelle: 100 μm . $N = 8$. * $P < 0.05$: significativement différent de la moyenne pre-DI.

8.3. Altérations fonctionnelles du muscle quadriceps

8.3.1. Diminution de la force maximale isométrique volontaire et altération de la cinétique de montée en force

Les résultats de la force d'extension isométrique volontaire maximale du genou, obtenue avec un dispositif ConTrex, ont été modélisés et séparés en deux phases distinctes, la génération de couple et les phases de relaxation. Nos résultats ont montré une diminution significative de la courbe globale de la génération de couple après 3 jours de DI (Figure 38A). En effet, la modélisation indique une diminution significative de la force maximale volontaire de 11,9% (de $185,3 \text{ Nm} \pm 56,7 \text{ Nm}$ à $163,2 \text{ Nm} \pm 42,2 \text{ Nm}$; $N=10$; $\chi^2 = 28,33$, $P < 0,001$). Cette valeur de diminution de force a été normalisée par l'aire de section mesurée par IRM. On observe ainsi une diminution significative de 9,1% après 3 jours de DI (de $1,99 \pm 0,54 \text{ Nm} / \text{cm}^2$ à $1,82 \pm 0,42 \text{ Nm} / \text{cm}^2$; $P = 0,048$, Figure 38C). Ce résultat indique donc une diminution de la force produite par unité de surface ce qui est beaucoup plus représentatif dans un aspect individuel au détriment d'un aspect général confondant tous les sujets. En effet, avoir normalisé par la taille du quadriceps de chaque sujet et de façon respective est beaucoup plus précis en terme de précision. La montée en force (la constante K_{ACT}) a été considérablement réduit de 29% passant de $7,8 \text{ s}^{-1} \pm 4,4 \text{ s}^{-1}$ à $5,5 \text{ s}^{-1} \pm 2,8 \text{ s}^{-1}$ ($N= 10$; $P = 0,014$; Figure 38D).

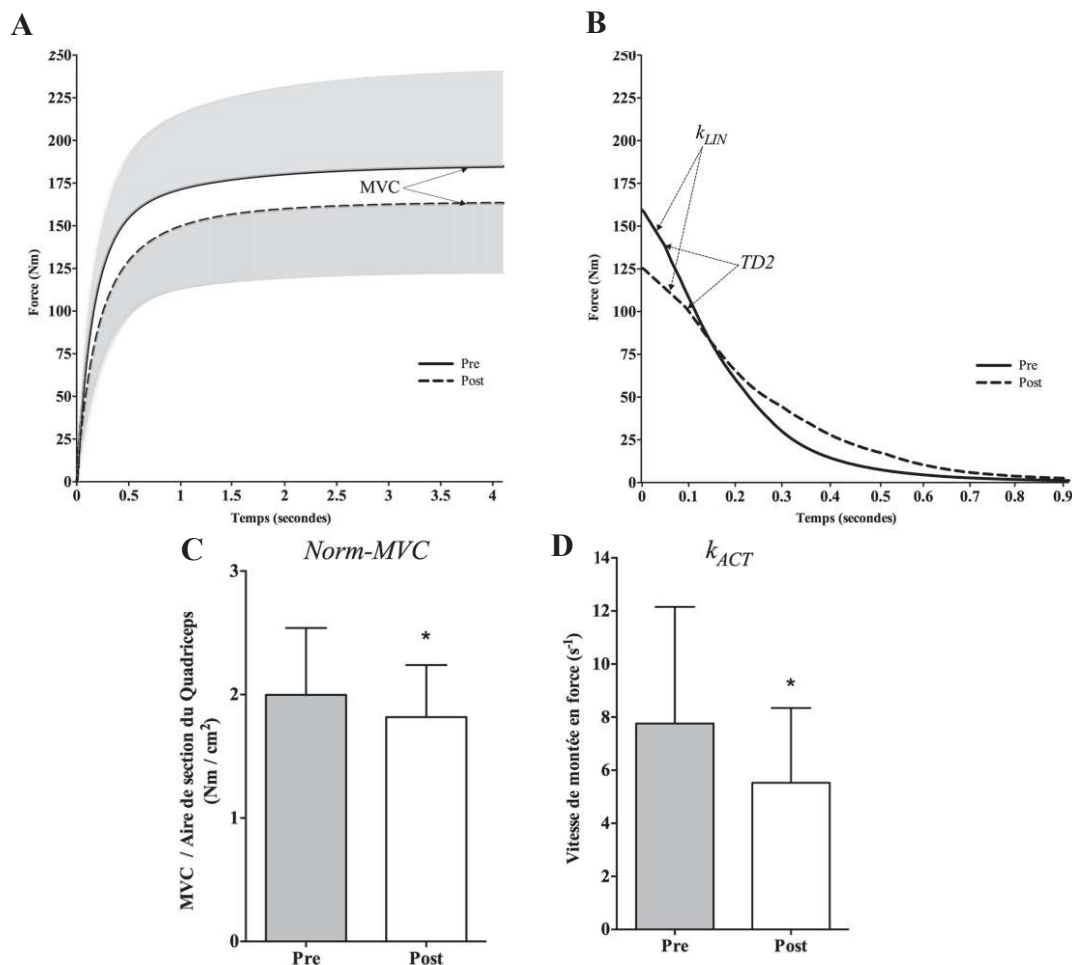


Figure 38 – Modélisation de la force maximale isométrique volontaire du quadriceps avant et après 3 jours d'immersion sèche.

A : Modélisation lors de la phase de génération de force des sujets lors de l'étude. *B* : Modélisation lors de la phase de relaxation de force des sujets lors de l'étude. *C* : Force maximale isométrique (Nm). *D* : Force maximale isométrique par unité de surface mesurée (Nm/cm²) * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$: significativement différent de la moyenne pre-DI.

8.3.2. Altérations de la force maximale isométrique volontaire lors de la phase de relaxation

Nous avons également observé une modification significative de la courbe globale de la phase de relaxation ($\chi^2 = 382,7$, $P < 0,001$; $N=10$, Figure 38B). La moyenne de la pente de la phase linéaire lente a été significativement diminuée de 44% (de -438 U.A. ± 261 U.A. à -243 U.A. ± 193 U.A., $P = 0,028$, $N=10$; Figure 39A).

Le point d'arrêt correspondant à la fin de la phase linéaire lente et au début de la phase exponentielle rapide (constante TD 2) a été significativement augmenté de 196% (de 116 ms ± 73 ms à 227 ms ± 137 ms; $P = 0,004$, $N=10$; Figure 39C). Enfin, le taux de développement

de la force concernant la phase de relaxation (la constante k_{REL}) a été significativement augmenté de 34% (de $7,2 \text{ s}^{-1} \pm 2,8 \text{ s}^{-1}$ à $9,6 \text{ s}^{-1} \pm 4,4 \text{ s}^{-1}$, $P = 0,040$; $N=10$; Figure 39B).

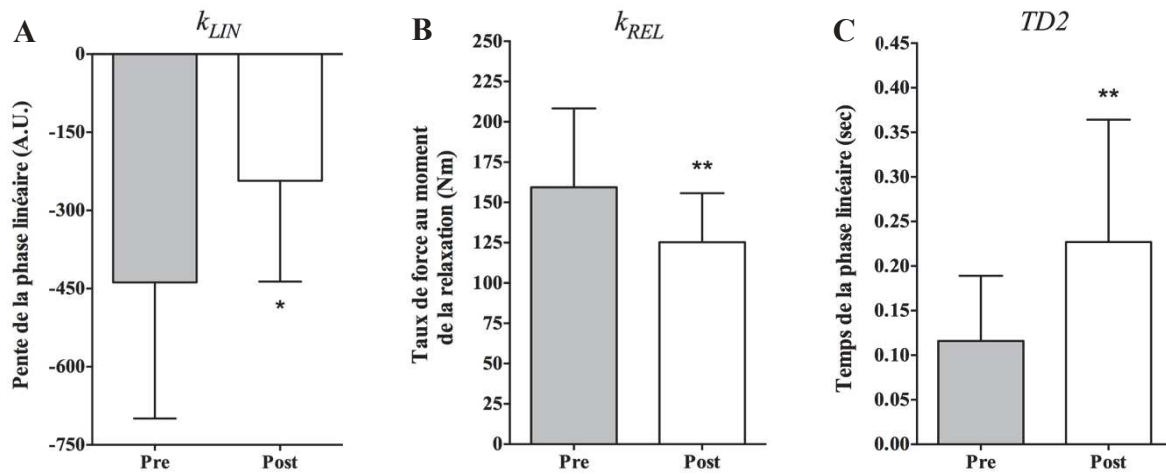


Figure 39 – Analyse des constantes relatives à la phase de relaxation

(A) : Montée en force : Pente de la phase linéaire (U.A.) (B) : Moyenne \pm SD du taux de force lors de la relaxation (C) : Moyenne \pm SD du temps correspondant à la fin de la phase linéaire et au début de la phase exponentielle.

8.4. Des modifications macroscopiques du Quadriceps après seulement 3 jours de DI

L'aire de section du quadriceps a été déterminée pour chaque sujet en utilisant une IRM avant DI et près de la fin de l'expérience (lors DI3). Nos résultats ont rapporté des changements significatifs d'aire de section. En effet celle-ci a montré une diminution significative de 2,4% (de $88,7 \text{ cm}^2 \pm 14,0 \text{ cm}^2$ à $86,5 \text{ cm}^2 \pm 13,5 \text{ cm}^2$, $P = 0,001$, $N=9$; Figure 40).

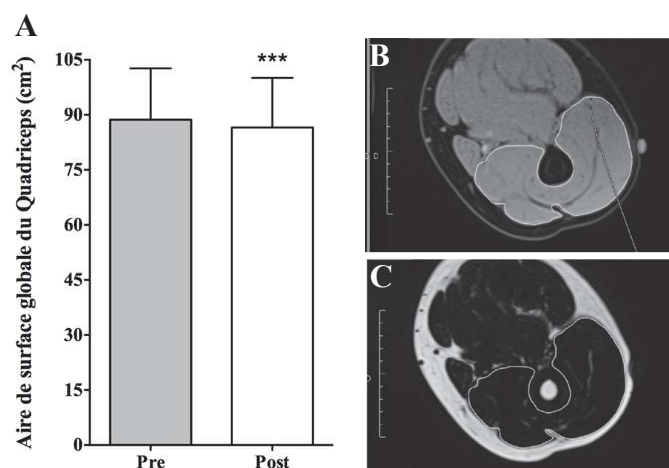


Figure 40 – Mesure de l'aire de section du quadriceps par imagerie à résonance magnétique avant et après 3 jours d'immersion sèche

A : Aire de section du quadriceps (cm^2) mesurée par Imagerie à Résonance Magnétique avant et après 3 jours d'immersion sèche. B : Illustrations issues de l'imagerie à résonance magnétique de la quantification du volume du quadriceps (cm^2) avant (haut) et après (bas) 3 jours d'immersion sèche. ($N=9$) ; ***, $P < 0,001$, significativement différent de la moyenne Pre.

8.5. Effets de 3 jours d'immersion sèche sur l'adiposité musculaire

8.5.1. Approche macroscopique

Le contenu en infiltrations graisseuses intramusculaires a dans un premier temps été quantifié de manière non invasive par IRM, en utilisant la méthode Dixon à 3 points (T1 Dixon Axial W / F). Nos résultats ont montré que le contenu intramusculaire en lipides représentait $6,0\% \pm 2,7\%$ de la CSA du compartiment quadriceps avant DI, et ce pourcentage était inchangé après 3 jours de DI, $6,0\% \pm 5,4\%$ (Figure 41).

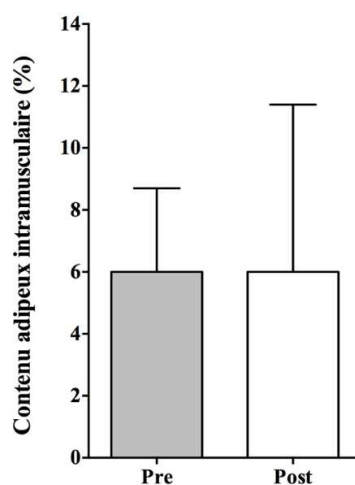


Figure 41 - Contenu adipeux intramusculaire (%) mesuré dans la cuisse par IRM

Contenu adipeux intramusculaire (%) au niveau de la cuisse, mesuré par Imagerie à Résonance Magnétique avant et après 3 jours d'immersion sèche. (N=9).

8.5.2. Effets de 3 jours d'immersion sèche sur les mécanismes de l'adipogenèse ectopique musculaire

Cette partie concerne plus spécifiquement l'identification et la caractérisation des précurseurs fibro-adipogéniques. Ces résultats font l'objet d'une récente publication scientifique (Pagano *et al.*, 2017).

Il a été question de vérifier si le développement des IMAT pouvait être modifié sur une période courte d'inactivité sévère. En effet, comme développé en introduction, le développement des IMAT est concomitant de l'inactivité physique (Crosbie, Green, & Refshauge). Nous avons quantifié ici un ensemble de marqueurs moléculaires représentatifs à la fois de l'adipogenèse ectopique musculaire et d'adipocytes matures. L'expression des protéines de surface des adipocytes ont été quantifiés: la périlipine et le transporteur FABP4 (Fatty Acid Binding Protein 4), deux marqueurs principaux d'adipocytes matures

couramment utilisés dans la littérature. Nous avons observé une augmentation marquée de l'expression de la périlipine et de FABP4 après 3 jours d'immersion sèche (+ 80% (p = 0,03) et + 40% (p = 0,048), respectivement, Figure 42a).

De plus, nous avons analysé la CSA des adipocytes et avons trouvé une augmentation Post-DI (Figure 42b). Malheureusement, le nombre de sujets sur lesquels la mesure IMAT CSA a pu être effectuée était trop faible pour une analyse statistique solide (n = 4 pour Pre-DI et n = 5 pour Post-DI), et ces différences n'ont pas atteint le seuil de significativité (P = 0,20, Figure 42c).

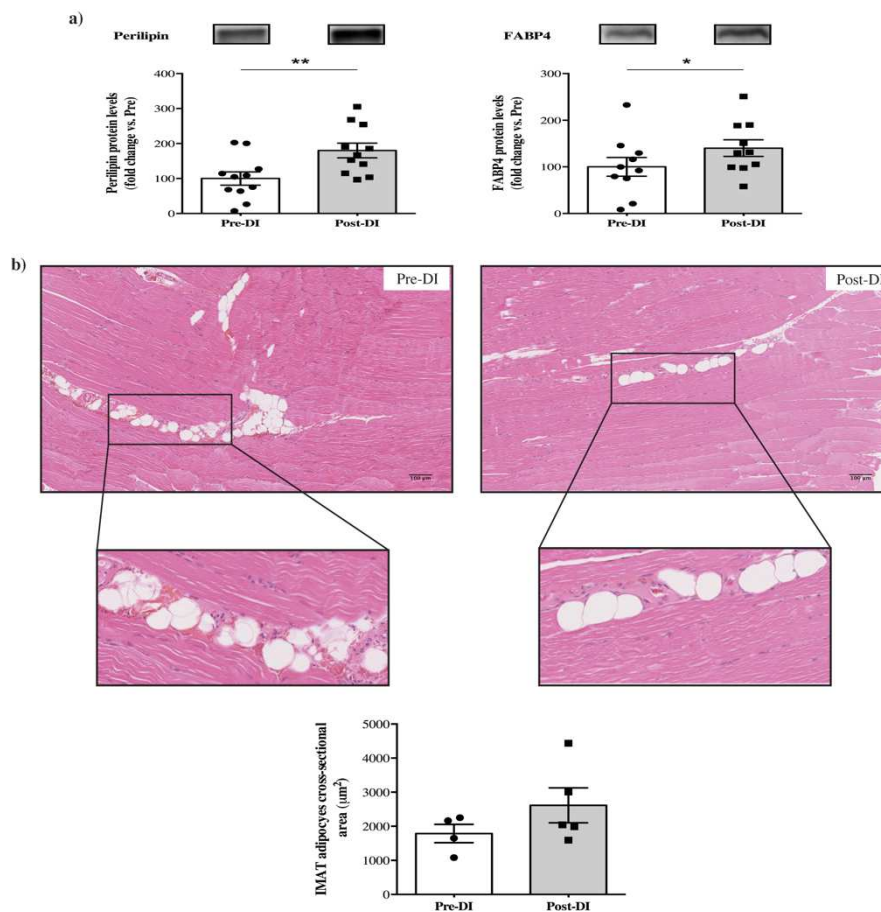


Figure 42 - Augmentation des IMAT

(A) Expression des niveaux de protéines Périlipine et FABP4 à partir de biopsies musculaires de *Vastus Lateralis* prises avant (Pré-DI) et après (Post-DI) 3 jours de DI. (B) Sections musculaires histologiques longitudinales de paraffine intégrées de muscles pré-DI et post-DI présentées avec une coloration à l'hématoxyline-éosine-safran. Les mesures de la surface de section des adipocytes (CSA) sont indiquées en μm^2 . * $P < 0,05$ et ** $p < 0,01$.

C / EBP β joue un rôle important au début de la différenciation adipocytaire. Fait intéressant, nous n'avons détecté aucune différence significative dans l'ARNm (-14%, p = 0,23) ou les niveaux de protéines (+ 6%, p = 0,414) de C / EBP β après 3 jours d'immersion sèche (Figure

43a). À la lumière de nos résultats antérieurs concernant les marqueurs adipocytaires matures, qui indiquaient que le processus d'adipogenèse était déjà très engagé, nous avons émis l'hypothèse que les marqueurs adipogéniques en aval de C / EBP β seraient exprimés différemment. Nous avons donc analysé les niveaux d'ARNm et de protéines de PPAR γ et C / EBP α . De manière surprenante, aucune différence significative n'a été détectée pour l'induction de l'ARNm de PPAR (-5%, p = 0,21), alors qu'une augmentation de l'expression de la protéine PPAR γ (+ 64%, p = 0,038; Figure 43b) a été observée. En outre, l'expression de la protéine C / EBP α a augmenté après l'immersion sèche (+ 108%, p = 0,022), et nous avons observé une augmentation similaire de l'induction de l'ARNm de C / EBP α (+ 127%, p = 0,0006; Figure 43c). Conformément aux résultats pour les marqueurs adipocytaires matures, l'expression élevée de C / EBP α et PPAR γ après 3 jours de DI semble également indiquer une augmentation des processus adipogéniques tardifs, favorable au développement des IMAT.

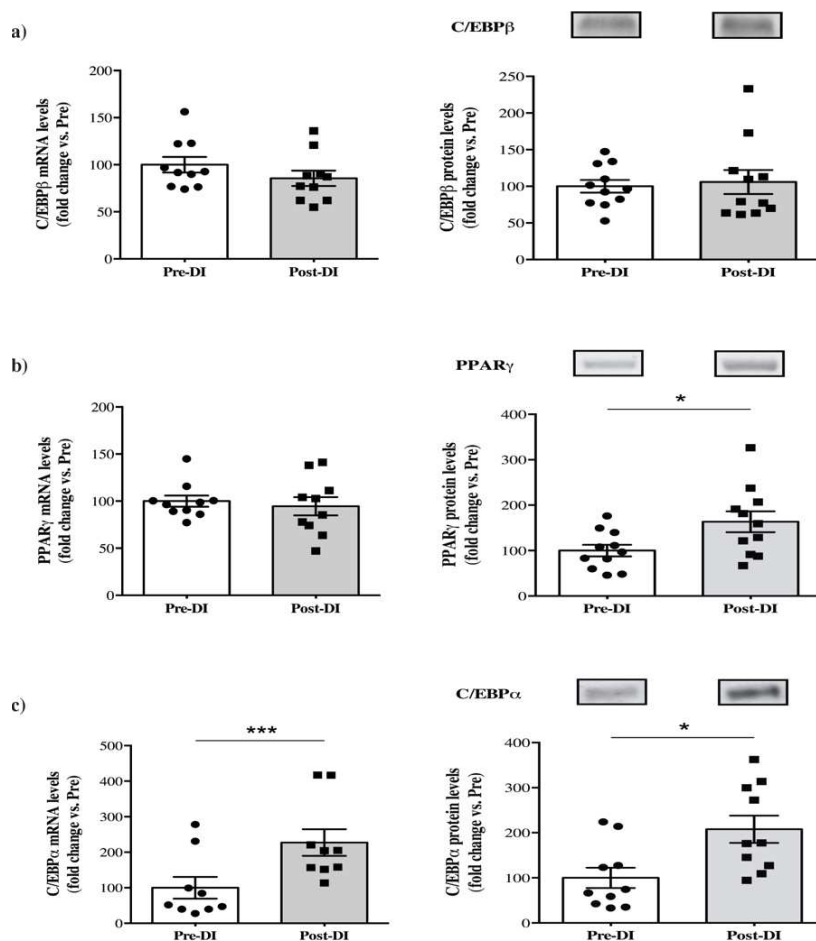


Figure 43 – Changements d'expression des marqueurs clés adipogéniques

A) Expression des niveaux d'ARNm et de protéines de C / EBP β dans les biopsies musculaires vastus lateralis prélevés avant (Pré-DI) et après (Post-DI) 3 jours de DI. B) Expressions des niveaux d'ARNm et de protéines PPAR γ dans les biopsies de muscles pré-DI et post-DI. C) Changements dans les niveaux d'ARNm et de protéines C / EBP α dans les biopsies de muscles pré-DI et post-DI.

8.5.3. L'immersion sèche promeut la prolifération des FAPs

Chez les souris, les FAPs sont bien connus comme les principales cellules souches impliquées dans le développement d'IMAT (Uezumi *et al.*, 2011). Nous avons émis l'hypothèse que ces cellules souches mésenchymateuses, identifiées dans de nombreuses études avec le marqueur de surface cellulaire PDGFR α , seraient impliquées dans le développement d'IMAT observé dans notre étude. Nous avons donc quantifié les niveaux d'ARNm et de protéine PDGFR α après 3 jours de DI. Nous avons constaté une diminution mineure mais significative de la quantité d'ARNm (-15%, $p = 0,019$; Figure 44a), alors que les niveaux de protéine étaient augmentés (+ 47%, $p = 0,007$; Figure 44a). L'up régulation de PDGFR α a ensuite été confirmée par analyse immunohistochimique (+ 26%, $p = 0,022$; Figure 44b). Par conséquent, parallèlement à une augmentation des marqueurs adipocytaires matures et C/EBP α , l'augmentation de l'expression de PDGFR α souligne probablement la prolifération des FAPs en réponse à 3 jours de DI. Dans un environnement défavorable, ces FAPs sont connus pour conduire au développement d'IMAT.

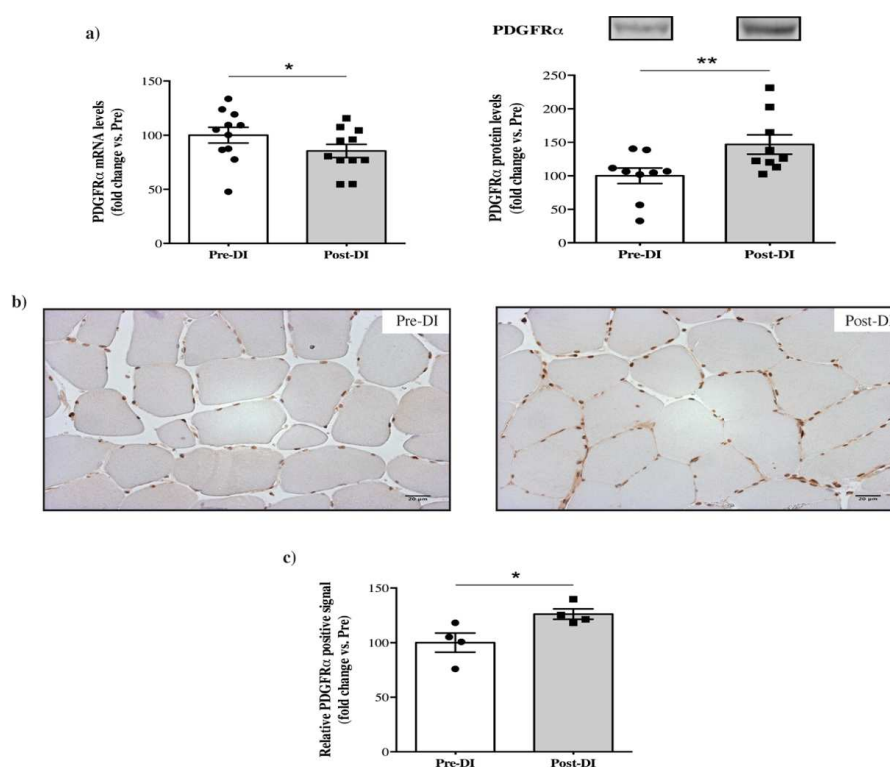


Figure 44 - Quantification du marqueur de surface PDGFR α des progéniteurs fibro-adipeux (FAPs)

A) Changements des niveaux d'expressions d'ARNm et de protéine PDGFR α dans les biopsies musculaires du Vastus Lateralis prélevés avant (Pré-DI) et après (Post-DI) 3 jours de DI. B) Immunomarquage PDGFR α sur coupes paraffine de Vastus Lateralis. C) Quantification des signaux positifs au PDGFR α . * $P < 0,05$ et ** $P < 0,01$

8.5.4. L'immersion sèche n'altère pas les marqueurs de la fibrose

Les FAPs sont connus pour pouvoir se différencier soit en adipocytes, soit en fibrocytes. Par conséquent, nous avons également quantifié certains marqueurs clés pour évaluer des altérations du dépôt de la matrice extracellulaire. Nous avons constaté une nette diminution des niveaux d'ARNm d' α SMA (-60%; $p = 0,0002$) et du CTGF (facteur de croissance du tissu conjonctif, -50%, $p = 0,001$) après 3 jours de DI. En outre, nous n'avons trouvé aucune différence dans les niveaux d'ARNm de la fibronectine (-10%, $p = 0,197$) et du collagène de type 1 α (Col1a1; + 104%, $p = 0,148$). Ces résultats peuvent indiquer que l'immersion sèche pendant 3 jours ne favorise pas le développement de la fibrose (Figure 45).

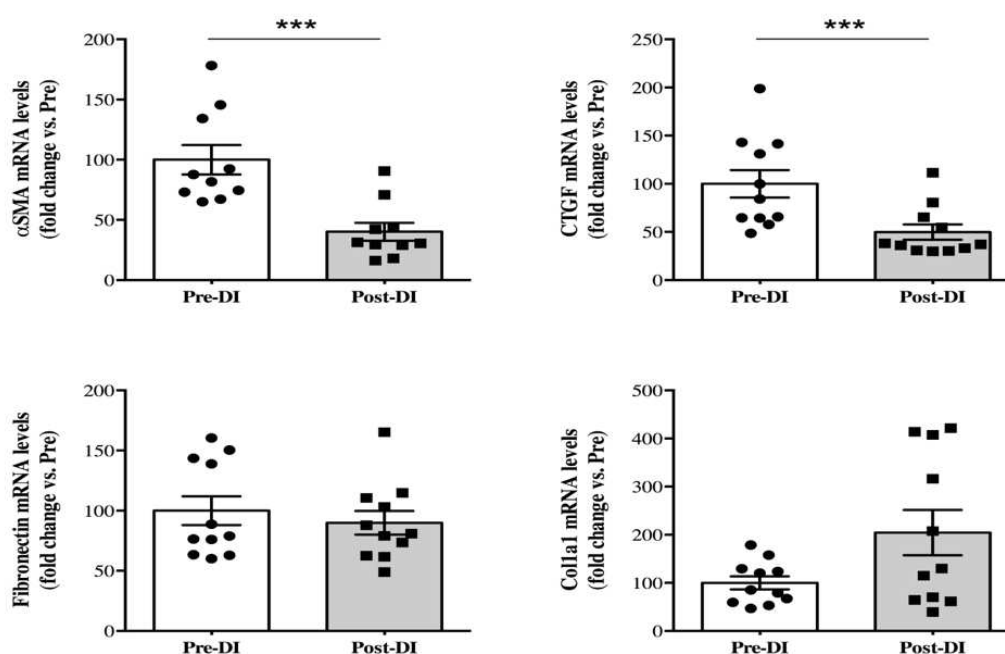


Figure 45 - Changements dans les niveaux d'expressions des marqueurs clés de la fibrose après 3 jours de DI

*Changements d'expressions des niveaux d'ARNm de α SMA, CTGF, fibronectine et ARNm de Col1a1 dans les biopsies musculaires de Vastus Lateralis prises avant (Pré-DI) et après (Post-DI) 3 jours de DI. ***, $P < 0,001$.*

8.6. Altérations des propriétés viscoélasticité du Rectus femoris : raideur, tonus et élasticité musculaire

Les caractéristiques mécaniques du muscle *rectus femoris* ont été déterminées à l'aide du MyotonPro, un myomètre manuel, et cela à différents points de cinétiques. Les mesures ont été effectuées avant le début de l'immersion sèche (pré-DI), pendant les 3 jours de DI (DI1 et

DI3) et post-DI (Figure 46). À l'aide de ce myomètre, la réponse viscoélastique du muscle a été évaluée par trois paramètres: la mesure de la raideur dynamique (Figure 46A), la fréquence d'oscillation (Figure 46B) et la décrémentation logarithmique (Figure 46C). En utilisant une ANOVA à mesures répétées, nos résultats ont mis en évidence une interaction au cours des 3 jours de DI pour chacun des trois paramètres d'intérêt.

En ce qui concerne la mesure de la raideur dynamique, qui caractérise la résistance du muscle à la force changeant de forme lors d'une sollicitation, nous avons repéré une diminution de 7,3% ($P = 0,002$) de cette raideur après seulement un jour (DI1) de DI par rapport à la valeur initiale pré-DI ($F = 16,200$; $P = 0,001$, Figure 46A). En ce qui concerne les mesures de la fréquence d'oscillation, qui caractérisent le tonus musculaire, nos résultats ont rapporté une diminution significative de la fréquence après un jour (DI1) et trois jours (DI3) de DI, respectivement, de 10,2% ($P = 0,002$) et de 10,4% ($P = 0,013$) par rapport à la valeur initiale pré-DI ($F = 8,188$; $P = 0,003$, Figure 46B). En outre, nous avons observé une augmentation de la fréquence d'oscillation dans la mesure post-DI par rapport à DI1 et DI3, respectivement, de 10,9% ($P = 0,008$) et de 11,1% ($P = 0,029$).

Enfin, en ce qui concerne le troisième paramètre, qui nous renseigne sur l'élasticité musculaire, nos résultats ont démontré une augmentation du décrétement logarithmique à DI3 et à la condition post-DI, respectivement, de 31,5% ($P = 0,004$) et de 13,7% ($P = 0,014$) par rapport à la pré -DI valeur ($F = 7,284$; $P = 0,007$, Figure 46C).

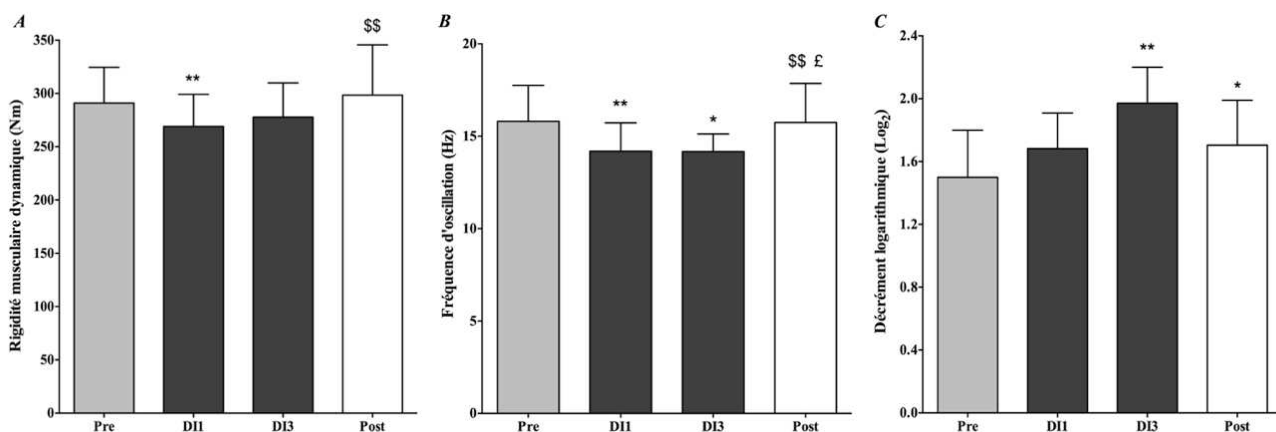


Figure 46 – Évaluations des propriétés viscoélastiques du *Rectus Femoris* mesurée avec le MyotonPro®

A : Évaluation de la rigidité musculaire (Moyenne \pm SD ; Nm) du rectus femoris mesurée avant l'immersion sèche (Pre), au premier jour (DI1), au troisième jour (DI3) et après l'immersion sèche (Post) ; $N=9$. *B* : Évolution de la fréquence d'oscillation (Moyenne \pm SD ; Hz) du rectus femoris mesurée avant l'immersion sèche (Pre), au premier jour (DI1), au troisième jour (DI3) et après

*l'immersion sèche (Post) ; N=9. C : Évolution du décrement logarithmique (Moyenne \pm SD ; Log₂) du Rectus femoris mesuré avant l'immersion sèche (Pre), au premier jour (DI1), au troisième jour (DI3) et après l'immersion sèche (Post) ; N=9. *, P<0.05 ; **, P<0.01, significativement différent de la moyenne Pre. **, P<0.01, significativement différent de la moyenne DI1. ££, P<0.01, significativement différent de la moyenne DI3.*

8.7. Marquage indirect du processus de dénervation

NCAM (CD56) est classiquement utilisé pour identifier les fibres musculaires engagées dans un processus de régénération ou de dénervation (Arentson-Lantz *et al.*, 2016; Mosole *et al.*, 2014) Nos résultats ont révélé un petit nombre de fibres musculaires NCAM⁺, principalement à la fin de la période DI : même si cela concerne un faible nombre de fibres musculaires, une augmentation significative de 6 fois a été reportée (P = 0,002, N=9, Figure 47A).

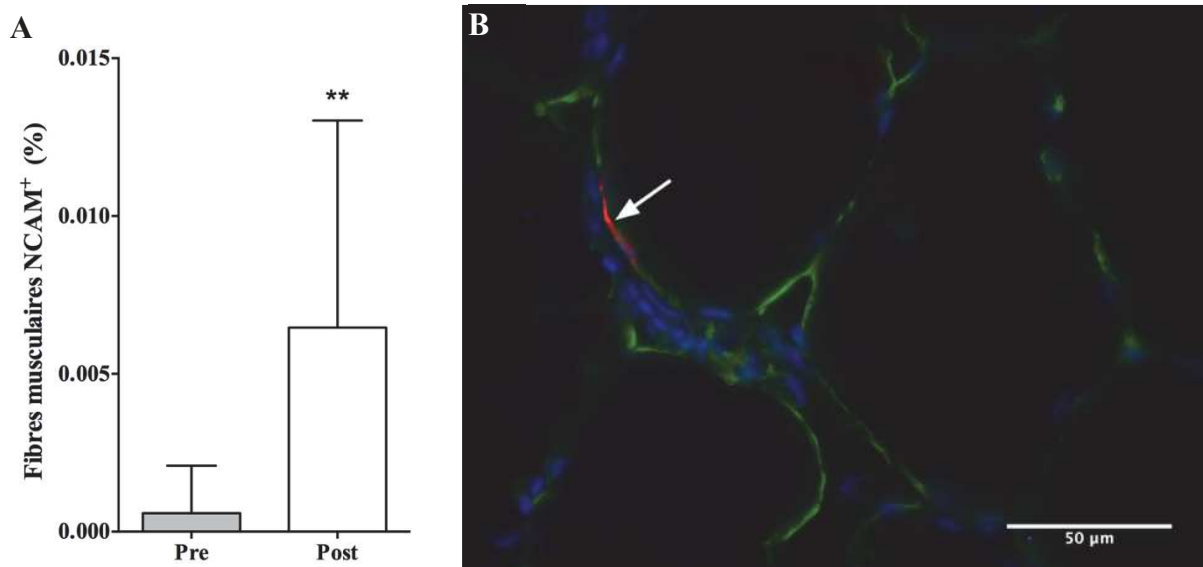


Figure 47 - Apparition précoce de fibres musculaires dénervées identifiées avec le marqueur NCAM/CD56

*A, Quantification des fibres musculaires NCAM⁺ exprimée en fonction du nombre total de fibres. B, Immunomarquage NCAM⁺/CD56 d'un fibre musculaire. La flèche rouge indique le marquage spécifique NCAM⁺/CD56. Les noyaux sont identifiés avec un marquage DAPI (bleu), et les fibres musculaires avec l'anticorps anti-laminine (vert). Échelle : 50 μ m. N = 9. **, P<0.01, significativement différent de la moyenne Pre.*

8.8. Quantification des niveaux d'expression protéique par Western-blot

8.8.1. Modifications de la balance protéique

L'analyse des niveaux d'expressions des protéines correspondant à la caractérisation de la balance protéique (Figure 48) indique une diminution significative de RPS6 de $69,8\% \pm 12,4\%$ ($p < 0,01$, $N=11$) et de Atrogin-1 de $25,5\% \pm 7,4\%$ ($p < 0,01$; $N=11$). On observe une tendance concernant la diminution de $16,8\% \pm 11,9\%$ de l'expression de 4EBP1 ($p=0,054$, $N=12$) mais aussi pour la diminution de l'expression de TRIM32 de $15,2\% \pm 13,1\%$ ($p=0,053$; $N=10$). Nos résultats indiquent une augmentation significative de l'ubiquitination de $18,3\% \pm 8,7\%$ ($p=0,043$; $N=10$). Cependant on observe une tendance concernant l'augmentation de l'expression de MuRF-1 de $41,8\% \pm 18,8\%$ ($p = 0,064$; $N=10$). Aucune significativité n'est retrouvée concernant le changement d'expression de FoXO3A ($-1,4\% \pm 13,7\%$) ; mais aussi concernant l'expression de Akt ser473 et p70S6K ; respectivement $+44,8\% \pm 17,6\%$, $p=0,32$; et $+42,9 \pm 17,6\%$, $P=0.12$).

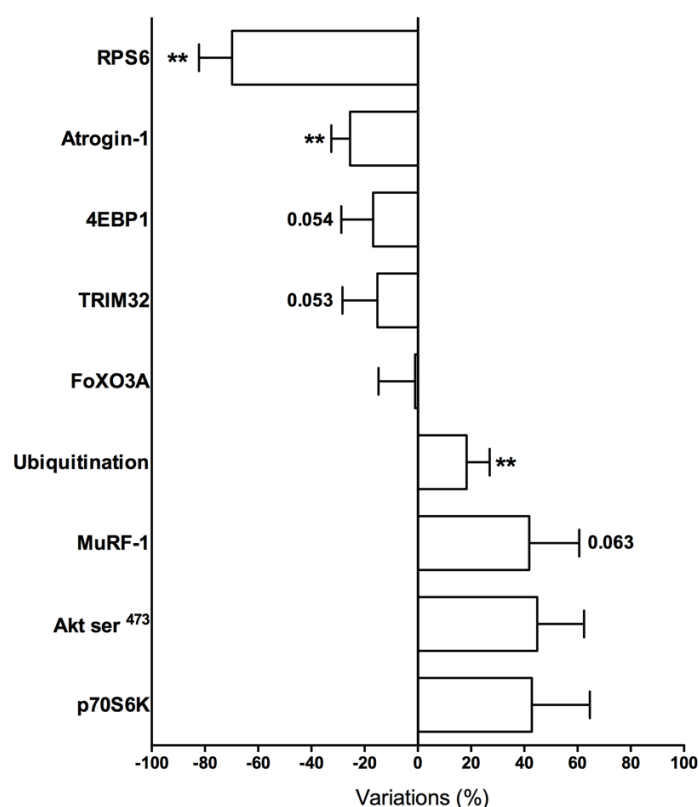


Figure 48 - Variations de l'expression protéique des acteurs principaux de la balance protéique mesurée par western-blot

Représentation du pourcentage de variation Post vs. Pré des protéines caractérisant la balance protéique. **, $p < 0,01$; Post. Vs. Pré ; $N=10, 11$ ou 12 selon les protéines quantifiées.

8.8.2. Modifications dans la mitochondriogénèse

L'analyse des niveaux d'expressions des protéines correspondant à la caractérisation de la mitochondriogénèse (Figure 49) indique une diminution significative de MFN2 de $32,9\% \pm 12,1\%$ ($p=0,011$, $N=10$), de Citrate Synthase de $12,3\% \pm 5,1\%$ ($p<0,001$; $N=11$), de Cox IV de $11,6\% \pm 6,6\%$ ($p = 0,026$; $N=12$) et de Sirtuin-1 de $7,7\% \pm 12,03\%$ ($p = 0,021$; $N=11$). On observe une tendance concernant la diminution de $23,5\% \pm 7,3\%$, de l'expression de Mul-1 ($p=0,065$, $N=12$). Nos résultats indiquent une augmentation significative de p38 de $16,6\% \pm 7,3\%$ ($p=0,043$; $N=10$). Aucune significativité n'est retrouvée concernant le changement d'expression de PGC1 α ($-23,5\% \pm 7,2\%$) ; mais aussi concernant l'expression d'AMPK ($+22,2 \pm 34,4\%$; $P=0.21$).

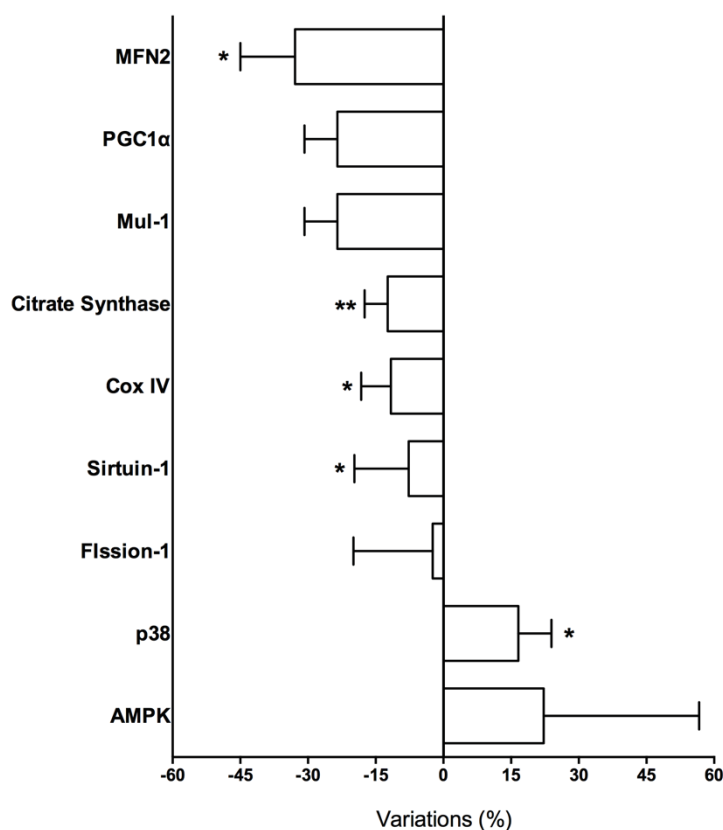


Figure 49 - Variations de l'expression protéique des acteurs principaux de la mitochondriogénèse mesurée par western-blot

Représentation du pourcentage de variation Post vs. Pré des protéines caractérisant la mitochondriogénèse. *, $p<0,05$, **, $p<0,01$; Post. Vs. Pré ; $N=10$, 11 ou 12 selon les protéines quantifiées.

8.9. Analyse du transcriptome par RNA-Seq

8.9.1. Analyse globale des RNA-seq

Dans un premier temps, l'analyse RNA-seq de cette étude est représentée avec la Figure 50. Il s'agit d'une représentation sous forme de MA-plot (Le M pour les log-ratios ; et le A pour « Average »). Ce type de graphique est donc un plot de la moyenne (en x) contre le ratio (en y) de deux valeurs: l'expression d'un gène dans deux conditions, chaque gène étant un point du graphe. Il représente ainsi l'expression de l'ensemble des gènes du transcriptome des sujets, soit environ 18000 gènes.

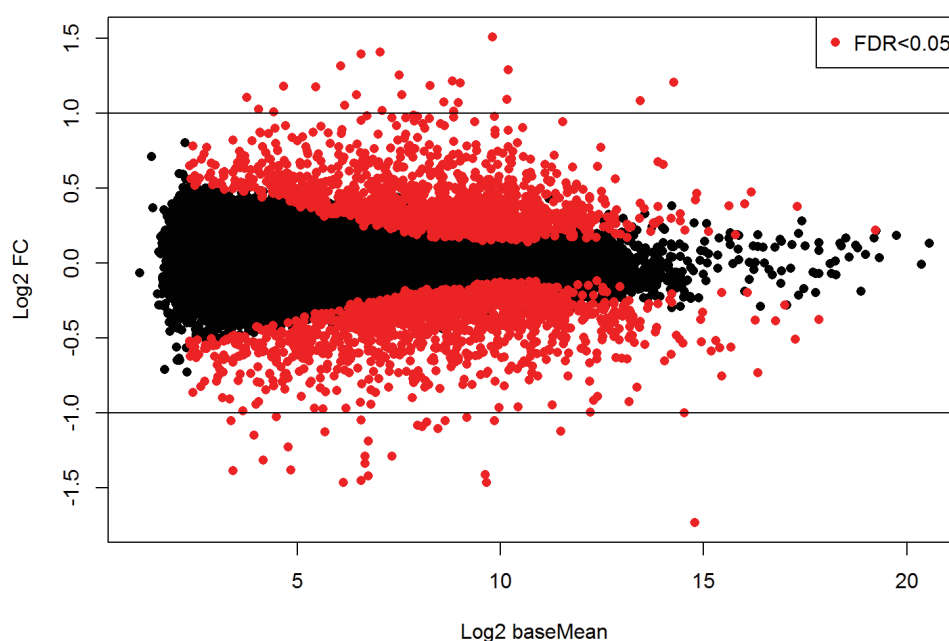


Figure 50 – MA-plot du transcriptome après 3 jours d'immersion sèche.

Représentation de l'expression de chaque gène (Log_2) en fonction du ratio du changement d'expression (Log_2). Les points noirs représentent les gènes dont les changements d'expressions ne sont pas significatifs. Les points rouges représentent les gènes dont les changements d'expression sont significatifs.

8.9.2. Tri des gènes en fonction de leurs variations d'expressions (Log_2 Fold-Change)

La représentation du MA-plot de la Figure 50 nous indique donc un total de 2872 gènes dont les changements d'expressions sont significatifs ($p\text{-value} < 0.05$).

Grâce à une analyse effectuée avec le logiciel Excel, nous avons pu trier les gènes en fonction du ratio des changements d'expression exprimés en Log_2 . Ceci aboutit donc à la Figure 51,

qui représente cette répartition du nombre de gènes en fonction du changement d'expression. Ce tri, à partir des 2872 gènes significatifs, permet d'obtenir une liste de gènes down-régulés comportant 1418 gènes ; et une liste de 1454 gènes up-régulés.

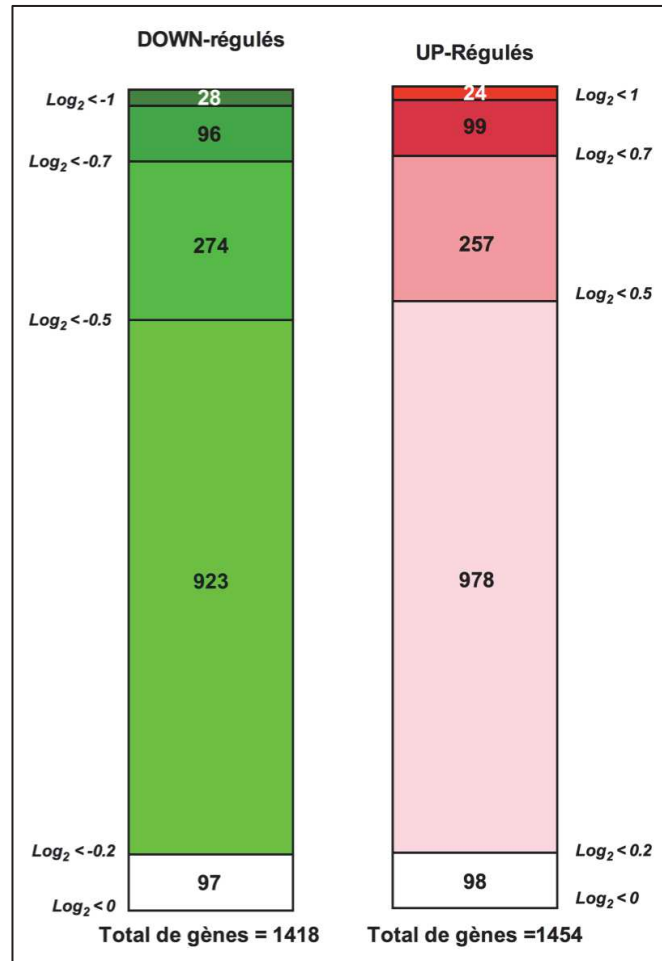


Figure 51 - Distribution du nombre de gènes up- ou down-régulés exprimée en Log₂
Représentation du nombre de gènes selon leurs changements d'expression exprimé en Log₂. Les gènes down- et up-régulés sont classés et ordonnés selon leurs changements.

8.9.3. Effet de l'immersion sèche sur le transcriptome humain

A partir de la liste des 2872 gènes dont l'expression a été significativement altérée par l'immersion sèche, nous avons décidé d'illustrer l'effet de l'immersion sèche sur les changements d'expression des différents gènes. L'utilisation du logiciel *GenePattern* nous a permis de représenter l'effet de l'immersion sèche sur les gènes dont la variation d'expression était significative. La représentation sous forme de Heatmap (Figure 52) illustre les changements d'expression génique.

Cette représentation concerne les gènes dont l'expression est modifiée de façon significative ($p\text{-value} < 0.05$) mais avec le ratio de changement est égal à $\text{Log}_2 =] - 2; -0.6[\cup] 0.6; 2 [$. Ceci ne représente que 438 gènes.

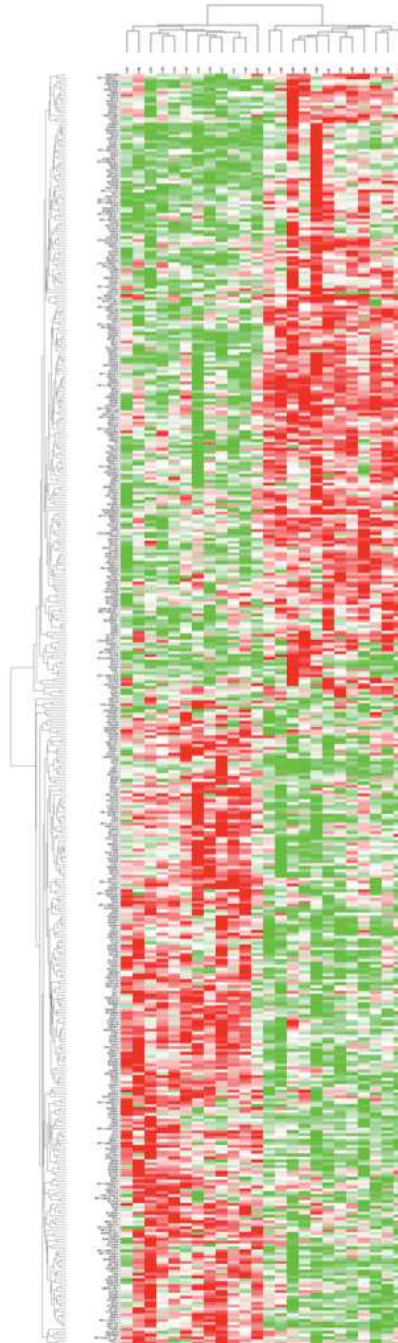


Figure 52 - Heatmap représentant l'expression des gènes significativement régulés par un fold change [0.6] lors de l'immersion sèche. Réalisé avec Genepattern[®], software.

8.9.4. Identification des voies canoniques

Le logiciel IPA® permet également à partir d'une liste de gènes établie de représenter les voies canoniques impliquées. De cette façon, la Figure 53 représente la voie canonique du muscle squelettique identifiant les gènes de l'étude impliqués. En vert est représenté les gènes down-régulés, en rouge les gènes up-régulés.

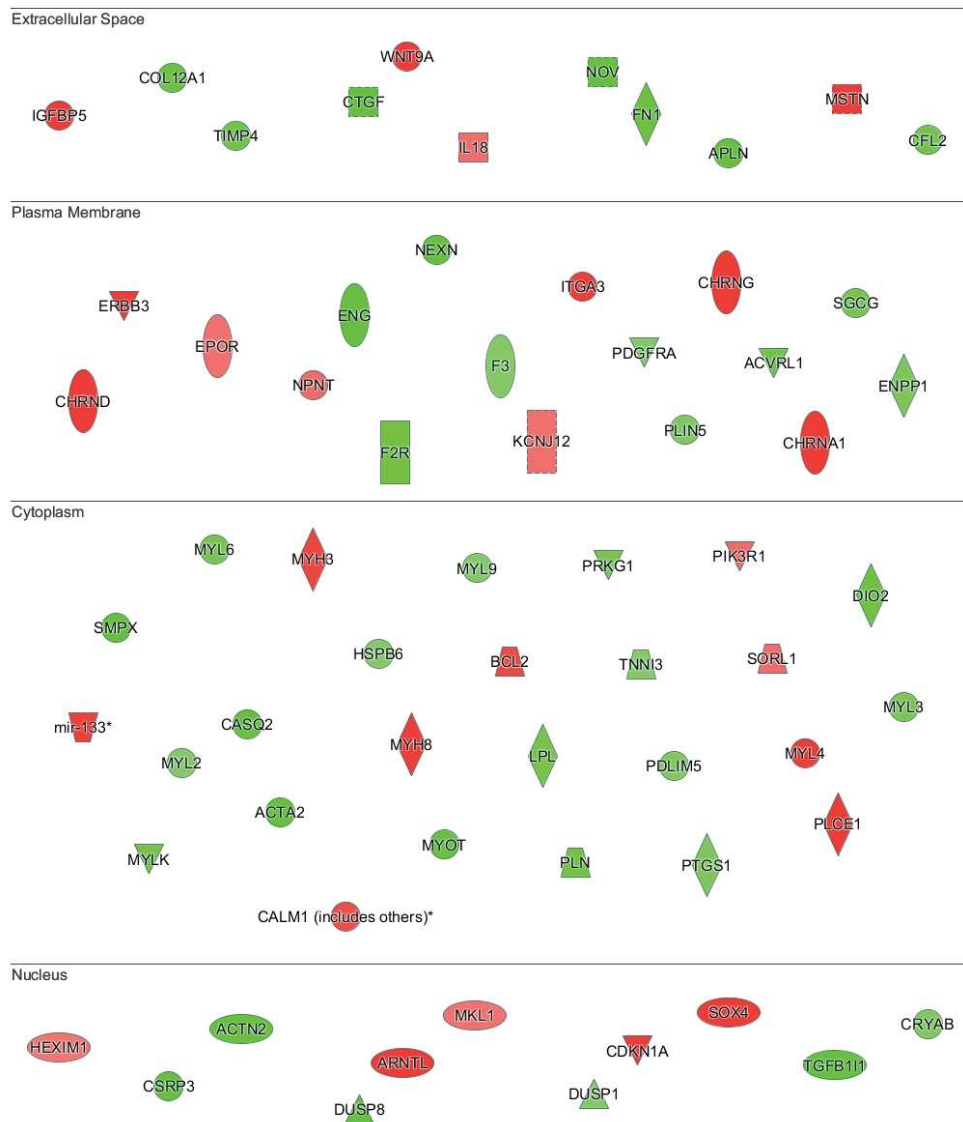


Figure 53 - Voies canoniques représentant l'interaction des gènes significativement régulés présent dans le muscle squelettique après 3 jours d'immersion sèche

9. Discussion

Les situations environnementales associées au déconditionnement musculaire se traduisent par une décroissance exponentielle de la masse musculaire, correspondant à des changements majeurs dans les premiers jours du déconditionnement musculaire (Bodine, Latres, *et al.*, 2001; Cros *et al.*, 1999). Or, le modèle DI est connu pour reproduire avec précision les effets de l'impesanteur sur le système musculo-squelettique plus rapidement que le modèle d'alitement prolongé et de façon plus sévère. Par conséquent, l'objectif de l'étude a été de caractériser les événements précoces du déconditionnement musculaire d'adultes en bonne santé. Nos résultats ont rapporté les effets d'une période d'hypoactivité sévère de 3 jours sur la fonction et la structure du quadriceps musculaire lors de la première étude réalisée en Europe en utilisant le modèle d'immersion sèche.

De plus, à notre connaissance, aucune étude antérieure n'a étudié les adaptations musculaires induites par l'immersion sèche avec des protocoles complémentaires utilisant des données histologiques, des analyses IRM, des mesures de myomètre et d'ergomètre isocinétique. Par ailleurs, des analyses biochimiques ont permis de mettre en évidence au niveau moléculaire quelques acteurs/voies signalétiques impliqués dans les altérations cellulaires. Ainsi, notre étude a clairement indiqué une diminution des propriétés fonctionnelles et des modifications structurelles du muscle quadriceps.

Nos résultats ont révélé que la perte de force du quadriceps MVC était d'environ 11%. Une augmentation d'environ 15% de la perte a été signalée après 5 semaines d'alitement prolongé (Krainski *et al.*, 2014), et aussi après des études cliniques d'alitement de 10 jours chez les personnes âgées (Kortebein *et al.*, 2007; Kortebein *et al.*, 2008). La littérature rapporte globalement une perte de force maximale volontaire du quadriceps jusqu'à 30% pour un alitement de 3 mois (Alkner & Tesch, 2004a). Ainsi, les expériences DI génèrent une plus grande perte de force que les études d'alitement, mais proche de celle des expériences d'immobilisation dans lesquelles le déconditionnement musculaire est également plus drastique que lors de l'alitement. À l'aide d'une modélisation mathématique précise des phases de contraction et de relaxation, nos résultats ont également rapporté une diminution du taux de développement de la force (K_{ACT}) de 29% entre pré et post-DI, en plus des modifications liées à la phase de relaxation. En effet, la phase de relaxation est biphasique (Poggesi, Tesi, & Stehle, 2005; Stehle, Kruger, & Pfitzer, 2002; Stehle, Kruger, Scherer, *et*

al., 2002; Tesi, Piroddi, *et al.*, 2002), avec une décroissance lente et linéaire de la vitesse au début (k_{LIN}), suivie d'une dégradation exponentielle rapide. Nos résultats ont rapporté une phase linéaire plus longue en Post-DI, associée à une pente inférieure. La littérature indique que des modifications liées à la décroissance de la force linéaire lente peuvent être associées à une diminution des concentrations de phosphate inorganique, ce qui pourrait expliquer le ralentissement de la phase de relaxation (Stehle, Kruger, & Pfitzer, 2002; Tesi, Colomo, *et al.*, 2002). Le k_{LIN} est également lié au taux de détachement de la tête de myosine, qui dépend de la vitesse de repompage du calcium par le réticulum, ce qui confirme le rôle de l'homéostasie du calcium dans l'altération des propriétés de relaxation. Ainsi, au-delà de la force maximale spécifique, les résultats originaux de notre étude liés aux changements de la contraction musculaire et de la cinétique de relaxation induites par DI, démontrent une réduction de la cinétique de contraction et de relaxation avec des diminutions significatives du k_{ACT} , du k_{REL} et du k_{LIN} . En ce qui concerne le développement de la contraction, le k_{ACT} dépend à la fois de la vitesse d'isomérisation des ponts (dépend de la libération du phosphate inorganique) et de la vitesse de libération de Ca^{2+} (c'est-à-dire le Ca^{2+} transitoire). Cela a été démontré dans l'étude de Py en 2015, dans laquelle une diminution claire du Ca^{2+} transitoire musculaire du muscle flexor digitorum brevis (similaire au phénotype du muscle extensor digitorum longus) était associée au traitement au clenbutérol (bêta2 agoniste) (Py *et al.*, 2015). Cela pourrait contribuer à une cinétique ralentie de la contraction musculaire suggérant fortement que l'immersion sèche agit sur certains des processus impliqués dans le couplage excitation-contraction, modulant ainsi la force et les caractéristiques de contractilité, probablement par une modification du devenir du calcium au sein du muscle.

Avec la diminution de la force musculaire, nous avons pu, en utilisant l'outil Myoton, objectiver des changements dans les propriétés mécaniques du chef musculaire rectus femoris. La validité de la technologie MyotonPro a été vérifiée dans différentes expériences pour mesurer le tonus et les propriétés viscoélastiques de plusieurs muscles squelettiques superficiels individuels (Aird *et al.*, 2012; Schneider *et al.*, 2015; L. Treffel, Dmitrieva, *et al.*, 2016). Nos résultats ont souligné des changements dans les trois paramètres mesurés. La diminution de la rigidité musculaire et de la fréquence d'oscillation associée à l'augmentation du décrétement logarithmique, démontre que le quadriceps a été significativement moins tonique pendant la condition DI. En effet, comme dans les expériences sous conditions d'impesanteur, le modèle DI induit une forte diminution de raideur en supprimant la charge mécanique et les tensions externes (Schneider *et al.*, 2015). De plus, une étude antérieure de

Reschke et collaborateurs ont montré que le réflexe d'étirement musculaire a diminué après une exposition à l'impesanteur (Reschke *et al.*, 2009). En effet, Treffel et al. a récemment montré une altération précoce du modèle postural pendant la récupération après DI dans la même expérience (L. Treffel, Dmitrieva, *et al.*, 2016). Notre étude a contribué à démontrer l'utilité de cet outil complémentaire en utilisant le membre inférieur pendant la DI. Le dispositif nous a permis de recueillir des données sur les changements musculaires avec une technologie non invasive. En tant qu'outil permettant une évaluation en temps réel des propriétés musculaires, cette technologie est d'une grande utilité pour les expériences de vol spatial simulées ou réelles ainsi que pour les performances sportives ou le suivi de la formation, lorsque les biopsies ne sont pas possibles ou ne sont pas autorisées pour des mesures répétées.

Dans les expériences de déconditionnement musculaire chez l'homme, les CSA musculaires sont généralement évaluées à l'aide d'une analyse IRM. Nos résultats ont rapporté une diminution de 2% du compartiment antérieur de la cuisse. Nous confirmons que les expériences DI peuvent induire une plus grande diminution de la taille musculaire que ce qui est observé dans les expériences d'alitement. Par exemple, un alitement de 7 jours a été associé à une diminution de 3% de la CSA des muscles antérieurs de la cuisse, un alitement de 20 jours associé à une diminution de 8%, 30 jours avec 10%, 60 jours avec 14% et 90 jours avec 18% (Alkner & Tesch, 2004a; Ferrando *et al.*, 1995; Kawakami *et al.*, 2001; Mulder *et al.*, 2006). Ces études antérieures soulignent clairement que la perte de muscle due au déconditionnement est définie par une décroissance exponentielle. Parallèlement aux mesures d'IRM, les biopsies musculaires nous ont permis d'étudier le déconditionnement musculaire au niveau cellulaire et de repérer une diminution significative de la CSA des fibres musculaires d'environ 10%, principalement attribuable aux fibres musculaires à contraction lente (MyHC I), ce qui se traduit par une proportion accrue de fibres plus petites. Nos résultats sont conformes à des études antérieures démontrant que 3 jours de DI peuvent induire une atrophie musculaire de 9% et 7 jours de DI, une atrophie musculaire d'environ 18% (Litvinova *et al.*, 2004; Navasiolava *et al.*, 2011). Encore une fois, ce résultat souligne l'ampleur de la perte musculaire précoce, non linéaire et précoce. À titre de comparaison, une expérience d'alitement a signalé une atrophie deux fois plus importante des fibres musculaires (18%) après 6 semaines d'hypoactivité (H. E. Berg *et al.*, 1997). Cependant, comme mentionné précédemment, notre résultat était proche du degré d'atrophie rapporté dans une expérience d'immobilisation. Une étude de Suetta et collaborateurs, par exemple, a

signalé une atrophie des fibres musculaires de 10% après seulement 4 jours d'immobilisation (Suetta *et al.*, 2012).

Les changements dans la myotypologie des fibres sont également classiquement rapportés dans les expériences de déconditionnement musculaire, et nous avons pu, après seulement 3 jours de DI, observer des changements significatifs, à savoir une diminution du pourcentage de fibres IIA et une augmentation de la proportion de fibres hybrides co-exprimant les types I et IIX (Baldwin *et al.*, 2013; Caiozzo, Baker, & Baldwin, 1998). Cette bascule vers un phénotype plus rapide souligne également que le maintien du phénotype lent est assuré par l'activation chronique de voies signalétiques comme Calcineurine/NFATc3/MEF /GATA (Bigard *et al.*, 2000).

Ces changements de myotypologie semblent être spécifiques aux premiers jours et aux premières semaines, car ils disparaissent après une longue durée de déconditionnement. En effet, les études de Berg *et al.* (1997) et Chopard *et al.* (2005) n'ont signalé aucun changement de myotypologie sur le même chef musculaire du *Vastus Lateralis* après 6 semaines et 3 mois d'alitement, respectivement (H. E. Berg *et al.*, 1997; Chopard *et al.*, 2005). Au niveau cellulaire, nous avons également étudié le degré de dénervation des fibres musculaires. En effet, les expériences de déconditionnement ainsi que le processus de vieillissement démontrent classiquement que l'ampleur de la perte de force est supérieure au degré d'atrophie (H. E. Berg *et al.*, 1997; M. J. Delmonico, Harris, Visser, Park, Conroy, Velasquez-Mieyer, Boudreau, Manini, Nevitt, Newman, Goodpaster, *et al.*, 2009; di Prampero & Narici, 2003; Jubrias *et al.*, 1997). Or parmi les adaptations repérées dans le déconditionnement musculaire on retrouve une perte de l'innervation des motoneurons alpha (Midrio, 2006). L'étude d'Arentson-Lantz et collaborateurs (2016), par exemple, ont rapporté une augmentation significative des fibres musculaires NCAM⁺ (de 2% à 4%) après 14 jours d'alitement (Arentson-Lantz *et al.*, 2016). Nos résultats ont révélé que seulement 3 jours de DI ont induit une augmentation faible mais significative du nombre de myofibres positives au NCAM⁺, ce qui suggère que la perte d'innervation motrice est un phénomène se déclenchant très précocement dans ce modèle d'hypoactivité sévère et pouvant expliquer l'inadéquation entre perte de masse et perte de force.

En outre, les muscles dénervés présentent des changements en partie similaires dans les propriétés myofibrillaires (Ansved & Larsson, 1989) à savoir une atrophie et un shift vers un phénotype plus rapide. Au cours du vieillissement, le nombre de fibres musculaires et

d'unités motrices diminuent chez les rongeurs et les hommes (Caccia, Harris, & Johnson, 1979; Edstrom & Larsson, 1987). Il a été suggéré que la diminution du nombre de fibres musculaires est due à la perte d'unités motrices entières et à la réintégration incomplète des fibres musculaires dénervées par les neurones moteurs restants (Caccia *et al.*, 1979; Edstrom & Larsson, 1987) résultant d'une diminution de la régénération axonale chez le rat âgé (Drahota & Gutmann, 1961). L'augmentation de l'expression de NCAM dans le muscle squelettique âgé observée dans ces études confirme cette hypothèse.

Notre étude contribue à la caractérisation des signatures précoces du déconditionnement musculaire. Cette information est d'une importance majeure pour le développement de contre-mesures précises, principalement liées à l'exercice et à la nutrition à mettre en place avant et pendant le vol spatial, l'alitement prolongé et l'immobilisation pour prévenir la perte précoce de la force musculaire.

*Publication scientifique de
l'étude*



Early structural and functional signature of 3-day human skeletal muscle disuse using the dry immersion model

Rémi Demangel¹, Loïc Treffel^{2,5}, Guillaume Py¹, Thomas Brioché¹, Allan F. Pagano¹, Marie-Pierre Bareille³, Arnaud Beck³, Laurence Pessemesse¹, Robin Candau¹ , Claude Gharib², Angèle Chopard¹  and Catherine Millet^{2,4}

¹Université de Montpellier, INRA, UMR866 Dynamique Musculaire et Métabolisme, Montpellier, France

²Université Claude Bernard Lyon 1, Lyon, France

³Institute for Space Medicine and Physiology (MEDES), Toulouse, France

⁴Service d'Odontologie, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France

⁵Université de Strasbourg, Centre National de la Recherche Scientifique, Unité Mixte de Recherche 7178, Strasbourg, France

Key points

- Our study contributes to the characterization of muscle loss and weakness processes induced by a sedentary life style, chronic hypoactivity, clinical bed rest, immobilization and microgravity.
- This study, by bringing together integrated and cellular evaluation of muscle structure and function, identifies the early functional markers and biomarkers of muscle deconditioning.
- Three days of muscle disuse in healthy adult subjects is sufficient to significantly decrease muscle mass, tone and force, and to induce changes in function relating to a weakness in aerobic metabolism and muscle fibre denervation.
- The outcomes of this study should be considered in the development of an early muscle loss prevention programme and/or the development of pre-conditioning programmes required before clinical bed rest, immobilization and spaceflight travel.

Abstract Microgravity and hypoactivity are associated with skeletal muscle deconditioning. The decrease of muscle mass follows an exponential decay, with major changes in the first days. The purpose of the study was to dissect out the effects of a short-term 3-day dry immersion (DI) on human quadriceps muscle function and structure. The DI model, by suppressing all support zones, accurately reproduces the effects of microgravity. Twelve healthy volunteers (32 ± 5 years) completed 3 days of DI. Muscle function was investigated through maximal voluntary contraction (MVC) tests and muscle viscoelasticity. Structural experiments were performed using MRI analysis and invasive experiments on muscle fibres. Our results indicated a significant 9.1% decrease of the normalized MVC constant ($P = 0.048$). Contraction and relaxation modelization kinetics reported modifications related to torque generation ($k_{ACT} = -29\%$; $P = 0.014$) and to the relaxation phase ($k_{REL} = +34\%$; $P = 0.040$) after 3 days of DI. Muscle viscoelasticity was also altered. From day one, rectus femoris stiffness and tone decreased by, respectively, 7.3% ($P = 0.002$) and 10.2% ($P = 0.002$), and rectus femoris elasticity decreased by 31.5% ($P = 0.004$) after 3 days of DI. At the cellular level, 3 days of DI translated into a significant atrophy of type I muscle fibres ($-10.6 \pm 12.1\%$, $P = 0.027$) and an increased proportion of hybrid, type I/II fibre co-expression. Finally, we report an increase (6-fold; $P = 0.002$) in NCAM+ muscle fibres, showing an early denervation process. This study is the first to report experiments performed in Europe investigating human short-term DI-induced muscle adaptations, and contributes to deciphering the early changes and biomarkers of skeletal muscle deconditioning.

R. Demangel and L. Treffel contributed equally to this work.

A. Chopard and C. Millet contributed equally to this work.

(Received 15 December 2016; accepted after revision 16 March 2017; first published online 22 March 2017)

Corresponding author A. Chopard: INRA UMR 866, Campus de la Gaillarde, Bat. 22, 2 place Pierre Viala - 34060 Montpellier, France. Email: angele.chopard@umontpellier.fr

Abbreviations BMR, basal metabolic rate; BR, bed rest; CD, cluster of differentiation; CSA, cross-sectional area; DI, dry immersion; MRI, magnetic resonance imaging; MVC, maximal voluntary contraction; MyHC, myosin heavy chain; NCAM, neural cellular adhesion molecule; VL, vastus lateralis.

Introduction

Skeletal muscle deconditioning can occur as a consequence of chronic hypoactivity, immobilization, or a microgravity environment (Chopard *et al.* 2009; Schiaffino *et al.* 2013; Briocche *et al.* 2016). In this context, the loss of muscle mass is associated with a reduced quality of life and a decrease in lifespan (Fitts *et al.* 2010; Narici & de Boer, 2011). For decades, spaceflight-related life science research has contributed to increase knowledge related to muscle disuse and to the optimization of the countermeasures (Alkner & Tesch, 2004*b*; Chopard *et al.* 2009). Astronauts experiencing short- or long-term exposure to microgravity are subject to a broad range of anatomical and physiological changes, impacting their work capacity, fatigability and health. Skeletal muscle deconditioning is one of several disorders that must be combated (Fitts *et al.* 2000; Jackman & Kandarian, 2004; Chopard *et al.* 2009). The understanding and prevention of microgravity-induced decreases in muscle mass and force is still a scientific challenge and has several clinical applications on earth. Indeed, bedridden patients, immobilization, sarcopenia, and cachexia are situations that stand to benefit from this area of research. Currently, the International Space Station is the main space infrastructure giving the opportunity to experiment in a weightless environment (Adams *et al.* 2003; Smith *et al.* 2005). However, the complexity of the muscle biopsy procedure, together with differences between astronaut work and exercise programmes, significantly restricts the opportunity to investigate scientific questions on muscle deconditioning in real microgravity (Trappe *et al.* 2001; Fitts *et al.* 2010).

Among the ground-based human models, head-down bed rest has been validated as a reliable simulation model for most physiological effects of spaceflight and has contributed for years to the description and evaluation of muscle changes associated with hypokinesia and hypodynamia (Adams *et al.* 2003; Chopard *et al.* 2005; Pavy-Le Traon *et al.* 2007). However, the dry immersion (DI) model (Fig. 1), which requires specific bulky baths, is known to reproduce accurately the effects of microgravity on the musculoskeletal system more quickly than the head-down bed rest model (Navasolava *et al.* 2011; Treffel *et al.* 2016*b*). Thus, short-term DI experiments are sufficient to induce muscle deconditioning and should allow scientists to focus their study on the early period of muscle deconditioning.

The literature on both animal and human experiments has shown for decades that the decrease in muscle mass is an exponential decay and involves major changes in the first days (Cros *et al.* 1999; Bodine *et al.* 2001; Kawashima *et al.* 2004). Real microgravity experiments, such as Skylab or STS-78, also reported also that the loss of limb muscle is an exponential function of the duration of the flight (Fitts *et al.* 2000). In this context, it appears crucial to investigate and decipher muscle deconditioning in this first drastic phase and to test countermeasures in order to identify and to avoid the early trigger mechanisms.

Skeletal muscle strength is tightly correlated to cross-sectional area (CSA) (Ikai & Fukunaga, 1968). However, muscle deconditioning translates, in the main studies, to a decrease in strength production that is more important than the reduction in muscle mass, volume, or even CSA (Berg *et al.* 1997; Alkner & Tesch, 2004*b*; Manini *et al.* 2007). This last parameter should always be considered and questions remain about the early, fast period of muscle deconditioning. There are at least two hypotheses to explain the discrepancy between the degree of strength loss and the degree of atrophy: a potential process of fibre denervation, and an increase in intermuscular fat deposit (Marcus *et al.* 2010). Others factors could also be involved, such as change of pennation angle and alteration of excitation–contraction coupling, but these are beyond the scope of this paper. In a very recent study, Arentson-Lantz and colleagues (2016) have shown an increased number of myofibres expressing neural cellular adhesion molecule (NCAM) after 14 days of bed rest, indicating an increased percentage of denervated fibres (Arentson-Lantz *et al.* 2016). Whether a loss of motor neuron innervation occurs after only 3 days of hypoactivity has never been investigated.

Therefore, the purpose of the present study was to dissect out the effects of short-term 3-day DI on healthy human quadriceps muscle function and structure. Muscle function was investigated through maximal voluntary contraction (MVC) tests and mechanical characteristic measurements using MyotonPRO technology. Structural experiments were performed using data from magnetic resonance imaging (MRI) analysis, coupled with invasive measurements of muscle fibre CSA, and the evaluation of changes in myotypology. To our knowledge no previous study has investigated short-term DI-induced muscle adaptations with these complementary protocols

(histology, MRI, MyotonPRO and isokinetic ergometer) to further increase our knowledge of the early events of muscle deconditioning.

Methods

Ethical approval

All subjects gave informed consent to participate in this study, which was approved by the local Ethics Committee (Comité de Protection des Personnes Sud-Ouest outre-Mer I, France) in accordance with the *Declaration of Helsinki* and the French Health Authorities (number ID RCB: 2014-A00904-43).

Overall study design

Twelve healthy male subjects were selected for the experiment (mean \pm SD) age 32 ± 5 years; height: 179 ± 7 cm; weight: 74.5 ± 7.2 kg; BMI: 23.5 ± 1.6) (Table 1). The subjects had no medical history or physical signs of neuromuscular disorder; they were non-smokers taking no drugs and medication.

The dry immersion (DI) experiment was conducted in the MEDES-IMPS (space clinic, Rangueil Hospital, Toulouse, France) and was sponsored by the French National Space Agency (CNES). All subjects completed a period of DI for 3 days with a 3-day ambulatory control period before DI and a 2-day recovery period after DI. During the pre- and post-DI periods, all subjects remained active and ambulatory. During the DI period, the subjects remained immersed in a supine position in a controlled thermo-neutral bath ($33 \pm 0.5^\circ\text{C}$) continuously, except for a daily 20-min extraction for toilet procedures and weighing in a -6 deg head-down bed rest position (to preserve as much as possible the effects of simulated microgravity) and were instructed not to produce any unnecessary movements with their limbs. The study was

conducted in a quiet room at a stable temperature of $\sim 25^\circ\text{C}$. Room lighting was on between 07.00 and 23.00 h, and each subject had a daily medical examination. The dietary intakes were quantified by measuring the weight of each dish before and after (in case of leftovers) each meal, and by calculating the intakes for each nutrient. The calculation of the food content was done using a database specifically built from a validated European database. During the whole hospitalization phase, diet was monitored. Subjects received three principal meals (breakfast, lunch and dinner) and 1 snack per day (afternoon). The meals were defined by the MEDES nutritionist, provided by Toulouse Hospital and delivered to the subjects by the health assistants under the supervision of the MEDES nutritionist. Each volunteer had a tray with a well-balanced meal. Each food category was weighted and served taking into account the energy request of each subject. The subjects had to finish their tray. In case they did not, the leftovers were weighted again to record the ingested quantity with the maximum of accuracy. The dinner intake was adapted taking into account the possible lunch, breakfast and snack leftovers.

The main nutritional aspects were as follows. Liquid intake was between 35 and 50 ml kg^{-1} day^{-1} . On the first day of hospitalization, the basal metabolic rate (BMR) was calculated in kcal day^{-1} using the World Health Organization equations:

$$\text{Age} < 30\text{years} : \text{BMR} = 15.3 \times \text{body weight (kg)} + 679, \quad (1)$$

$$\text{Age} > 30\text{years} : \text{BMR} = 11.6 \times \text{body weight (kg)} + 879. \quad (2)$$

The reference weight was the weight measured on the morning 3 days before DI, before breakfast

Figure 1. Dry immersion experimental set-up

The subjects remain immersed in a supine position in a controlled thermo-neutral bath ($33 \pm 0.5^\circ\text{C}$) continuously, except for a daily 20-min extraction for toilet procedures and weighing (in a -6 deg head-down bed rest position). The subject is separated from the water by an elastic waterproof fabric and is instructed not to produce any unnecessary limb movements. [Colour figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

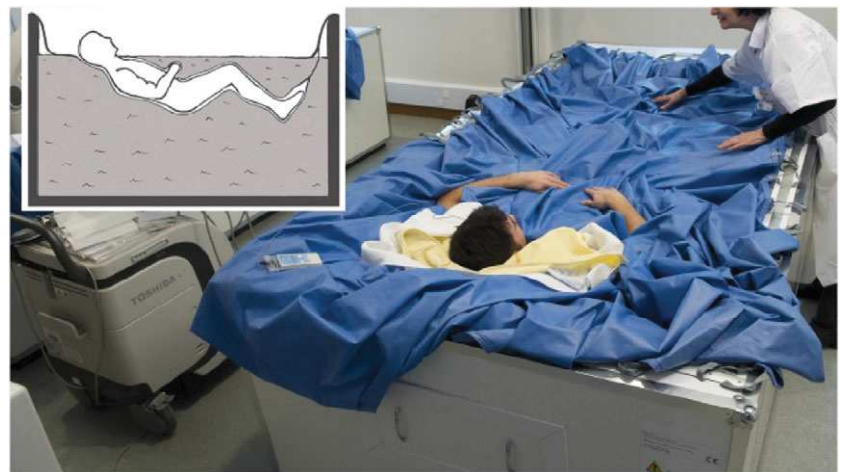


Table 1. Anthropometric data for the subjects before (Pre) and after (Post) 3 days of dry immersion

Subject	Age (years)	Height (cm)	Body weight (kg)		Body mass index (BMI)	
			Pre	Post	Pre	Post
A	39	167	66.6	66.0	23.9	23.7
B	39	183	86.2	84.9	25.7	25.4
C	34	172	77.9	75.6	26.3	25.6
D	36	183	71.7	70.0	21.4	20.9
E	33	184	73.5	72.3	21.7	21.4
F	26	174	72.1	71.1	23.8	23.5
G	30	174	66.7	65.2	22.0	21.5
H	28	182	80.8	78.9	24.4	23.8
I	34	189	86.1	84.8	24.1	23.7
J	26	178	68.8	68.7	21.7	21.7
K	30	180	77.0	75.8	23.8	23.4
L	26	169	66.2	65.8	23.2	23.0
Mean	32 ± 5	178 ± 7	74.5 ± 7.2	73.2 ± 6.9***	23.5 ± 1.6	23.1 ± 1.5***

Mean data are means ± SD. *** $P < 0.001$: significantly different from pre-DI value.

and after the first void. During the pre-immersion period and the recovery ambulatory period, caloric intake was equal to 160% of BMR. During the immersion period, caloric intake was equal to 130% BMR. The measured BMR was used for diet planning instead of the calculated value whenever it was feasible in practice. Macronutrient intake was controlled in terms of proteins ($1\text{--}1.2 \text{ g (kg BW)}^{-1} \text{ day}^{-1}$; without whey protein supplementation), total fat (35–38% of total energy expenditure) and carbohydrates (remaining). Electrolyte intake was controlled in terms of sodium (2000–4500 mg day⁻¹); potassium (3000–5000 mg day⁻¹); calcium (900–1200 mg day⁻¹) and chloride (750–4500 mg day⁻¹). Coffee, tea, alcohol, smoking, snacks and drugs were prohibited throughout the experiment. Only paracetamol was allowed if needed.

Maximal isometric voluntary contraction, rate of force development and rate of relaxation

Maximal isometric voluntary contraction (MVC) was assessed for knee extensors. The test was performed before and after the DI using a ConTrex device. A familiarization session was held before the first measurement to familiarize the volunteers with the equipment and the procedure of the test. For all the tests, the dominant limb was tested. The subject was firmly strapped, in the sitting position, to the examination chair when isometric MVC was being tested. The test protocol was as follows: after a short warm-up phase in a neutral position, the subject is required to perform a maximum extension followed 30 s later by a maximum flexion, and 30 s later by another pair of extension and flexion contractions until three complete sets of extension–flexion contractions have been recorded. Each contraction lasted 5–7 s.

A 2-min rest period was permitted between successive sets of three contractions. The total duration of the isometric MVC was 15 min. These data, acquired for a period of 30 s surrounding each contraction, were sequenced into distinct phases. The first phase represented a rest period of 7–8 s, zero force. Next, the subject was asked to perform a knee extension at 80 deg, inducing maximal voluntary isometric contraction of the thigh (the selected region). This period of contraction lasted 7 s. The raw individual data sampled at a frequency of 256 Hz were fitted using the mono-exponential function (see below, eqn (3)). The measured parameters were the maximal isometric torque for extension (MVC, N m), normalized by quadriceps cross-sectional area (norm-MVC, N m cm⁻²), the rate of force development (k_{ACT} , s⁻¹), and the rate of torque relaxation (k_{REL} , s⁻¹). The time course of full force relaxation was biphasic, starting with a slow and linear phase (slope of slow phase, k_{LIN} , a.u.), beginning with b (torque of relaxation phase, N m), and with k_1 , the magnitude constant of the fast mono-exponential phase (not evaluated). TD1 is the end-point of the torque generation and was not taken into account. When the linear phase ended, a time constant (TD2 constant, s) showed the beginning of a fast, mono-exponential relaxation phase (rate of force relaxation, fast k_{REL} , s⁻¹). Two fixed and independent constants (V and W) were used to distinguish three time-dependent phases. V was dependent on TD1, and W was dependent on TD2. The quality of the fit was assessed using the coefficient of determination (R^2).

$$y = \text{MVC} (1 - e^{-t \times k_{\text{ACT}}}) + V \times (k_{\text{LIN}} \times (t - \text{TD1}) + b) + W \times (k_1 (1 - e^{-(t - \text{TD2}) \times k_{\text{REL}})}), \quad (3)$$

where MVC = maximal voluntary contraction (N m); t = time (s); k_{ACT} = time constant of force development (s^{-1}); V = independent constant, 0 or 1; k_{LIN} = slope of slow phase (arbitrary units); TD1 = time delay constant 1 (s); b = beginning of the torque relaxation phase (N m); W = independent constant, 0 or 1; k_1 = magnitude constant (N m); TD2 = time delay constant 2 (s); k_{REL} = time constant of force relaxation, (s^{-1}); with $V = 0$ and $W = 0$ when $t < TD1$ and $t < TD2$; $V = 1$ and $W = 0$ when $t > TD1$ and $t < TD2$; $V = 0$ and $W = 1$ when $t > TD1$ and $t > TD2$.

Viscoelastic response of the muscle

The mechanical characteristics of the rectus femoris muscle were determined at rest using a hand-held myometer (MyotonPRO; Myoton Ltd, Estonia) 1 day before DI, on day 1 and day 3 of the DI period, and 1 day after DI. The feasibility of the myometer's use has been validated on lower limb muscles during parabolic flight (Schneider *et al.* 2015) and on jaw and cervical muscles during DI (Treffel *et al.* 2016a). Using this myometer, the viscoelastic response of the muscle was evaluated by applying a brief (15 ms) mechanical impulse (force 0.4 N) on the skin surface above the muscle. The mechanical deformation was delivered by the testing end of the device ($d = 3$ mm), held perpendicular to the skin surface. An integrated 3-axis digital acceleration sensor recorded the muscle oscillation in the form of an acceleration curve. The properties of the sensor are: amplitude range of ± 8 g in full range; resolution of 11 bits; output data rate and bandwidth 3.200 Hz; sensitivity $\pm 0.01\%$ due to the temperature change; and operating temperature -10 to $+55^\circ\text{C}$. If a curve failed to meet measurement parameters, an error message warned the experimenter to repeat the trials.

The device was used in multiscan mode, in which one measurement corresponded to the mean of 5 mechanical taps with a variation coefficient inferior to 3% to validate each measurement. The procedures have been reported in the literature (Aird *et al.* 2012; Chuang *et al.* 2012; Dietsch *et al.* 2014). These studies have demonstrated the validity and reliability of Myoton measures in limb, trunk and orofacial musculature. Moreover recent studies (Agyapong-Badu *et al.* 2013; Prunyn *et al.* 2015) reported an excellent interrater reliability with an interclass correlation of 0.81–0.98 on rectus femoris. From the oscillation acceleration signal, we investigated three parameters computed in real time by MyotonPRO software: dynamic stiffness, oscillation frequency and logarithmic decrement. Dynamic stiffness characterizes the resistance of the muscle to an external force that deforms its initial shape. This parameter was calculated as follows: $\text{stiffness} = m \times a_{\max} / \Delta l$, where m is the mass of the testing end of the myometer (kg), a_{\max}

is the maximal acceleration of oscillation (m s^{-2}), and Δl is the deformation depth of the muscle mass (Gavronski *et al.* 2007), with a reliability/precision of 3.9%. Oscillation frequency, which characterizes the muscle tone or the intrinsic tension in a relaxed muscle, was as follows: $f = 1/T$ (Hz), where T denotes the oscillation period in seconds with a precision of 1.1%. The logarithmic decrement of a muscle's natural oscillation indicates the muscle's elasticity.

Elasticity is the biomechanical property of a muscle that characterizes the ability to recover its initial shape after a contraction or removal of an external force. Elasticity is inversely proportional to the decrement. In theory a decrement of 0 (zero) represents absolute elasticity. It was measured with a reliability of 1.5% (testing certificate no. 2-034-11 in 09-09-2011).

During the tests, the subject lay in a relaxed supine position. A unilateral measurement was taken on the left rectus femoris muscle in the complete rest position in order to measure relaxed muscle properties. The testing end of the device was placed perpendicular to the surface of the middle portion of the rectus femoris. Anatomic landmarks were marked with a pen at the midpoint between the anterior superior iliac spine and the upper part of the patella, and all the measurements were taken on the same muscle point. All collected values were downloaded from the device to a computer for data analysis.

Magnetic resonance imaging

A classic Siemens-Avanto device was used in Toulouse Hospital (CHU Rangueil). Subjects were transferred to the MRI room in 10 min while maintaining the -6 deg head-down bed rest position in order to preserve as far as possible the effects of simulated microgravity. Imaging was performed over the course of 1 h outside the bath of water 4 days before DI and at the end of the DI period (day 3) before reambulation. T1 Dixon axial water/fat (W/F) concentration was measured at the same landmark point, noted during MRI analysis with a 'mark' (Fig. 6), which was used as a reference for placement of the magnetic field (FoV: 240 mm; TR: 6.98 ms; TE: 2.38 ms; section thickness: 5 mm; 30 slices; 560 Hz Px^{-1}). The mark was located exactly halfway between the left anterior superior iliac spine and the upper part of the ipsilateral (left) patella. The measurements were taken on the left side because of the biopsy on the right side. This condition was chosen to avoid inducing heterogenic signals in MRI analysis of the biopsy site.

The surface area and fat content were calculated by OsiriX MD software (v.7.0.1. 64-bit software). The same experimenter did the interpretation of data before and after DI. Three-point Dixon MRI was used to measure intramuscular fat content (IFC) as a percentage

inside the anterior muscle compartment from the images (Kovanlikaya *et al.* 2005*a,b*). The value was calculated from the average of three measurements in the two T1 axial Dixon W/F sequences using: $IFC (\%) = (F/W) \times 100$. The surface area of the anterior compartment of the thigh and the IFC were measured in the same region of interest (ROI) on images centred on the same landmark (Fig. 6). Each parameter was measured in three slices, one centred on the landmark, one above the mark, and one below. The measurements were repeated until agreement was within the 3% threshold, and the values were averaged, as described by Belavy *et al.* (2013).

Muscle biopsy

The muscle biopsy was performed 8–13 days before DI and on the final day of DI, before subject reambulation, from the right vastus lateralis (VL) of each volunteer in a supine position according to a well-established method using a 5 mm Bergström biopsy needle under sterile conditions and local anaesthesia (1% lidocaine) (Bergstrom, 1975). Pre- and post-DI biopsies were obtained from the same leg, as close to each other as possible because of potential anatomical variations. Pre- and post-DI muscle biopsies were placed on saline-soaked gauze, and one piece was selected with an optic microscope for the histological study (immunohistochemical classification of muscle fibres and cross-sectional area measurements). The muscle piece was immediately embedded in small silicone casts filled with a cryoprotectant (O.C.T. Compound, Sakura Finetek), immediately frozen in liquid nitrogen-cooled isopentane, and stored at -80°C until further analysis.

Immunohistochemistry

Transverse serial cross sections ($10\ \mu\text{m}$ thick) of VL samples were obtained using a cryostat maintained at -25°C (HM-560, Microm H), and mounted onto glass microscope slides. Before labelling, sections were dried and fixed for 10 min in acetone. Sections were then washed in phosphate buffered saline (PBS), blocked and permeabilized with 0.1% Triton-X100 and 20% horse serum. For muscle fibre typing and CSA determination, sections were incubated with anti-MyHC primary antibodies (anti-slow (I) MyHC, BA-D5, Developmental Studies Hybridoma Bank, 1:10; anti-fast (II) MyHC, M4276, Sigma-Aldrich, 1:200; and anti-fast (IIA) MyHC, SC-71, Developmental Studies Hybridoma Bank, 1:10) for 1 h at 37°C , followed by washes in PBS and incubation with the secondary antibodies (ALEXA 488, A11029, Invitrogen, 1:800; ALEXA 568, A11031, Invitrogen, 1:800) for 1 h. Fibre typing was manually determined, and the fibre sizes were analysed with ImageJ software (1.46r version). A total of approximately 300 myofibres per

sample were thus measured in double-immunostained pre- and post-DI VL cryosections. The percentage of denervation was evaluated using CD56/NCAM labelling. Muscles sections were incubated overnight at 4°C with anti-CD56/NCAM primary antibody (anti-CD56/NCAM, no. 555514, Biosciences, San Jose, CA, USA, 1:500), washed in PBS and incubated with the secondary antibody (goat anti-mouse IgG1, AF555, no. A21127, Invitrogen, CD56/NCAM, 1:1000) for 2 h at 37°C with goat anti-mouse IgG1. For nucleus labelling, slides were co-stained with DAPI prior to being mounted with fluorescent mounting media. Labelled fibres were manually determined on the overall samples. Images were taken with an Axiovert 200M inverted epifluorescence microscope (Zeiss) at $63\times$ magnification in oil. The camera used to take pictures was a CCD Kappa.

Statistics

As a result of various technical problems, some analyses did not include the data from all twelve subjects. For each experiment, the number of subjects (N) is indicated in the respective legend. The normality of each distribution was assessed with the Shapiro-Wilk normality test. All values are expressed as the mean (SD). Student's paired t tests were used to compare changes in torque generation, relaxation phases (norm-MVC, k_{REL} , k_{LIN} , and TD constants), quadriceps compartment CSA, intramuscular fat content, myofibre CSA and proportion, and percentage of NCAM+ muscle fibres. When data were not normally distributed, Wilcoxon's signed-ranked test was used to compare changes between pre- and post-DI (k_{ACT}). A one-way repeated measure ANOVA for was used to analyse muscle tone parameters (frequency, decrement) in pre- and post-DI samples, with $P < 0.05$ as statistically significant. Normality test failed for dynamic stiffness parameters and a Friedman's test was used. *Post hoc* testing was performed with Dunn's test when a significant main effect or interaction was found ($P < 0.05$).

For fibre CSA and typing evaluation, the χ^2 -test was used to determine whether differences between pre- and post-DI sample means were significant. A paired t test or Wilcoxon's test was used to determine a difference between pre- and post-DI. The level of significance was set at 0.05 for all comparisons. All analyses were performed with GraphPad Prism 6.0h.

Results

Anthropometrics data

All subjects performed the 3-day dry immersion experiment. We recorded a significant decrease of 1.6% in subject body weight and BMI ($P = 0.001$, Table 1).

Quadriceps muscle force (maximal voluntary isometric knee extension force)

The results of maximal voluntary isometric knee extension force, obtained with a ConTrex device, were modelled and separated into two distinct phases, the torque generation and the relaxation phases. Our results showed a significant decrease in the global curve of the torque generation phase after 3 days of DI (Fig. 2A). The norm-MVC constant decreased significantly by 9.1% after 3 days of DI (from

$1.99 \pm 0.54 \text{ N m cm}^{-2}$ to $1.82 \pm 0.42 \text{ N m cm}^{-2}$; $P = 0.048$, Fig. 2C). The rate of force development (the k_{ACT} constant) was decreased significantly by 29% (from $7.8 \pm 4.4 \text{ s}^{-1}$ to $5.5 \pm 2.8 \text{ s}^{-1}$; $P = 0.014$, Fig. 2D). We also observed a significant modification of the global curve of the relaxation phase (Fig. 2B). The mean of the slope of the slow linear phase decreased by 44% (from $-438 \pm 261 \text{ a.u.}$ to $-243 \pm 193 \text{ a.u.}$; $P = 0.028$, Fig. 2E). The breakpoint between the slow linear phase and the fast exponential phase (TD2 constant) increased significantly by 196%

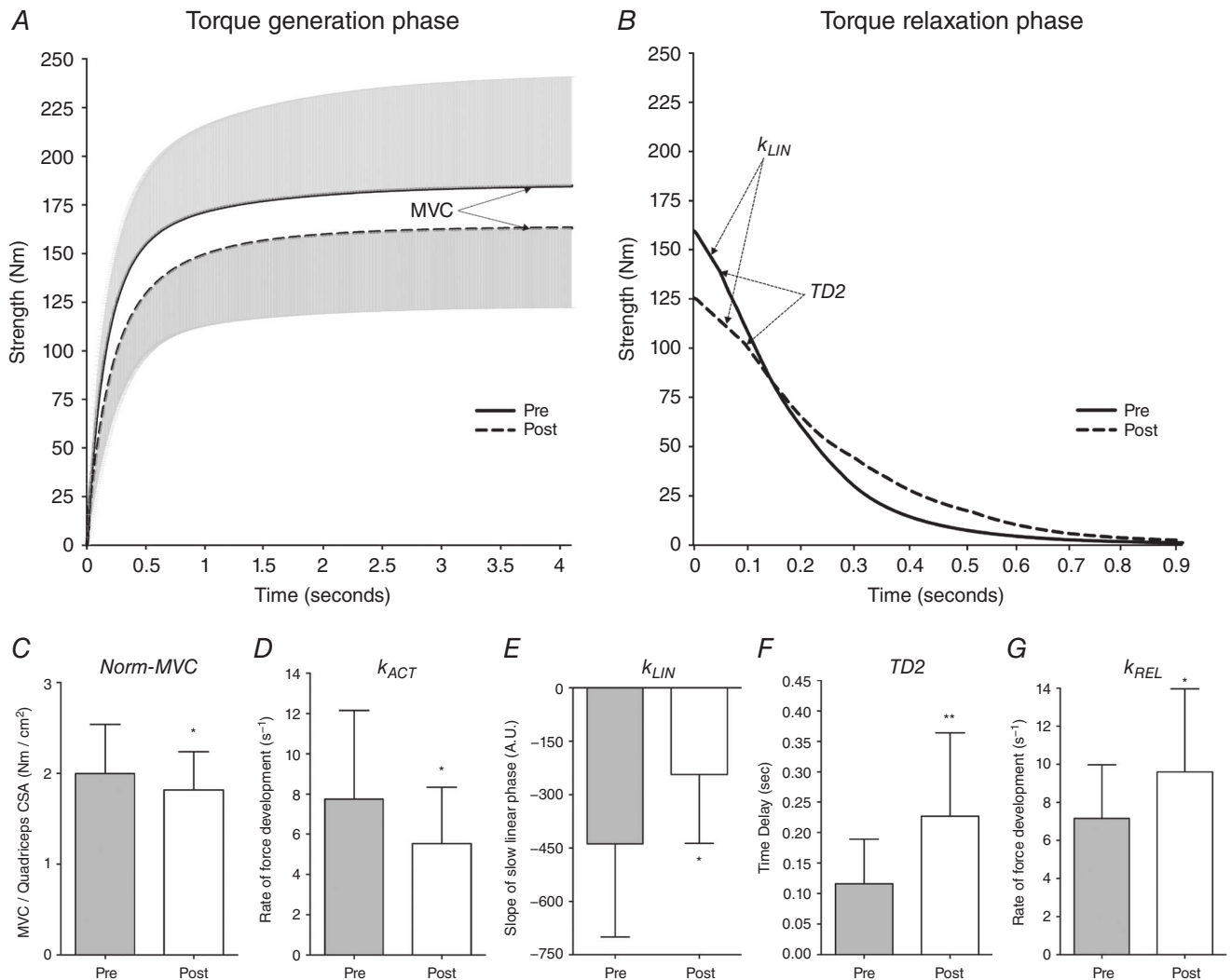


Figure 2. Maximal voluntary isometric knee extension torque decreased after 3 days of dry immersion (DI)
 A, means \pm SD of the torque generation phase of the maximal voluntary isometric knee extension torque, before (continuous line) and after (dashed line) 3 days of dry immersion (DI). The MVC constant is reported. B, means \pm SD of the torque relaxation phase before (continuous line) and after (dashed line) 3 days of DI. k_{LIN} and TD2 constants are reported. C, means \pm SD of the normalization between the maximal torque (N m) and the cross-sectional area of quadriceps muscle (cm²), the norm-MVC constant, before (grey bar) and after (white bar) 3 days of DI. D, means \pm SD of the rate of torque development (s⁻¹) during the torque generation phase, before (grey bar) and after (white bar) 3 days of DI. E, means \pm SD of the k_{LIN} constant before (grey bar) and after (white bar) 3 days of DI. F, means \pm SD of the TD2 constant before (grey bar) and after (white bar) 3 days of DI. G, means \pm SD of the k_{REL} constant during the torque relaxation phase before (grey bar) and after (white bar) 3 days of DI. $N = 10$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$: significantly different from pre-DI value.

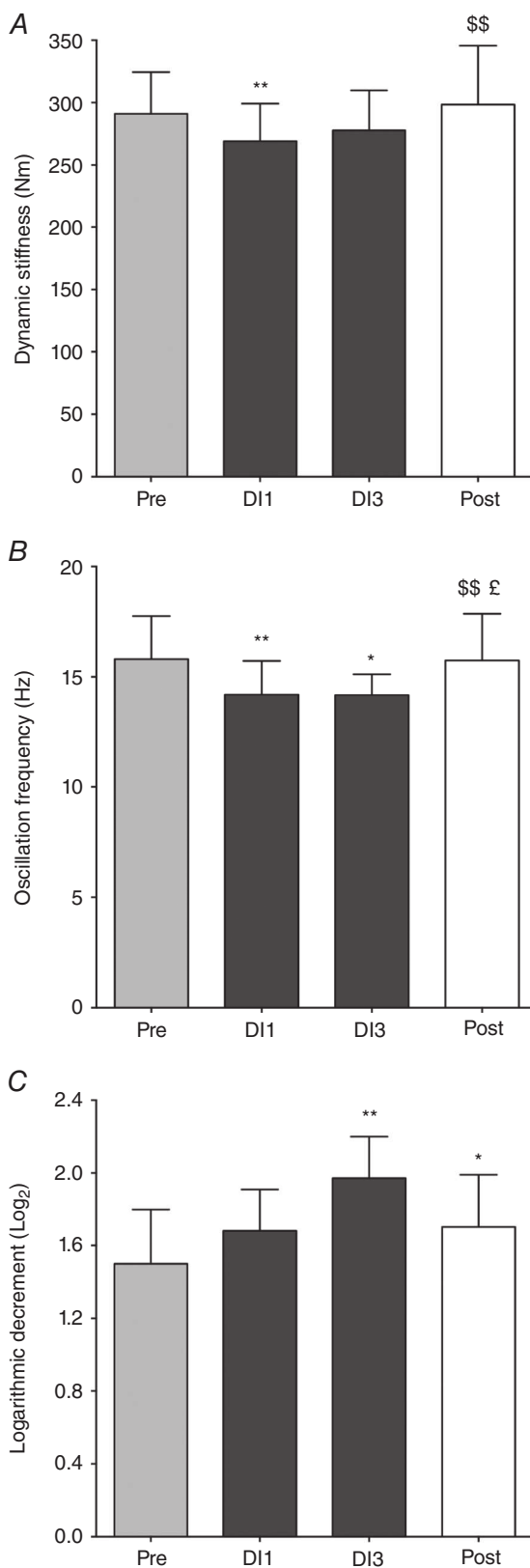


Figure 3. Muscle viscoelasticity properties are altered after 3 days of dry immersion (DI)

A, measurements of dynamic stiffness in pre-DI, DI1, DI3 and post-DI subjects. B, measurements of oscillation frequency (muscle tone) in

(from 116 ± 73 ms to 227 ± 137 ms; $P = 0.004$, Fig. 2F). Finally, the rate of force development for the relaxation phase (the k_{REL} constant) increased significantly by 34% (from 7.2 ± 2.8 s⁻¹ to 9.6 ± 4.4 s⁻¹, $P = 0.040$ Fig. 2G).

Viscoelastic response of the muscle

The mechanical characteristics of the rectus femoris muscle were determined using MyotonPRO a hand-held myometer, pre-DI, during the 3 days of DI (DI1 and DI3), and post-DI (Fig. 3). Using this myometer, the viscoelastic response of the muscle was evaluated through three parameters derived from the oscillation acceleration signal: the measurement of the dynamic stiffness (Fig. 3A), the oscillation frequency (Fig. 3B), and the logarithmic decrement (Fig. 3C). Using ANOVA, our results highlighted an interaction across the 3 days of DI for each of the three parameters of interest.

The dynamic stiffness measurement, which characterizes the resistance of the muscle to the force that changes its shape, decreased by 7.3% ($P = 0.002$) after 1 day (DI1) of DI compared to the pre-DI value ($F = 16.200$; $P = 0.001$, Fig. 3A). The oscillation frequency measurements, which characterize the muscle tone, decreased significantly after 1 (DI1) and 3 days (DI3) of DI, respectively, by 10.2% ($P = 0.002$) and 10.4% ($P = 0.013$) compared to the pre-DI value ($F = 8.188$; $P = 0.003$, Fig. 3B). Furthermore, we observed an increase in oscillation frequency in the post-DI measurement compared to DI1 and DI3 of, respectively, 10.9% ($P = 0.008$) and 11.1% ($P = 0.029$).

Concerning the third parameter, which indicates the muscle elasticity, we recorded an increase in logarithmic decrement at DI3 and on post-DI condition of, respectively, 31.5% ($P = 0.004$) and 13.7% ($P = 0.014$) compared to the pre-DI value ($F = 7.284$; $P = 0.007$, Fig. 3C).

Thigh anterior compartment MRI analysis

The size of the anterior compartment of the thigh was determined for each subject using MRI before DI and close to the end of the experiment (on DI3). Our results showed significant changes in the quadriceps area but not in its intramuscular fat content after 3 days of DI. The CSA of the quadriceps compartment showed a significant decrease of 2.4% (from 88.7 ± 14.0 cm² to 86.5 ± 13.5 cm², $P = 0.001$, Fig. 4A). The intramuscular fat content measurements were performed using a 3-point

pre-DI, DI1, DI3 and post-DI subjects. C, measurements of logarithmic decrement in pre-, DI1, DI3 and post-DI subjects. $N = 9$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$: significantly different from pre-DI value. \$\$ $P < 0.01$: significantly different from DI1. £ $P < 0.05$: significantly different from DI3.

version of the T1 Dixon axial W/F method. Our results showed that the intramuscular fat content represented $6.0 \pm 2.7\%$ of the quadriceps compartment CSA before DI, and this percentage was unchanged following 3 days of DI at $6.0 \pm 5.4\%$ (Fig. 4C).

Myofibre atrophy measurement and MyHC expression

Myofibre CSA was measured using a morphometric analysis of subject-matched pre- and post-DI VL biopsy samples (Fig. 5A–C). Analysis of mean fibre CSA in relation to fibre type showed a significant atrophy of slow, type I muscle fibres ($-10.6 \pm 12.1\%$); pre: $6540 \pm 1321 \mu\text{m}^2$ vs. post: $5846 \pm 1068 \mu\text{m}^2$; $P = 0.027$, Fig. 5A). Our results also showed significant changes in myotypology after 3 days of DI, which translate to a significant decrease in the proportion of type IIA fibres (from $49.8 \pm 9.1\%$ to $36.1 \pm 14.5\%$, $P = 0.049$), and an increase in the proportion of hybrid, type I/IIx fibre

co-expression (from $0.34 \pm 0.43\%$ to $1.30 \pm 1.38\%$, $P = 0.046$, Fig. 6B–D). When the morphometric analysis was examined as a binned histogram, we noted a clear leftward shift in fibre size distribution ($\chi^2 = 6.925$; $P = 0.008$), which highlighted the increased proportion of fibres with smaller CSA (Fig. 5B); this increase was enhanced for fibre sizes <2000 and $<2500 \mu\text{m}^2$ (respectively, $P = 0.039$ and $P = 0.027$). This leftward shift was evident in type I fibre size only ($\chi^2 = 6.256$, $P = 0.012$; Fig. 5C and D), which highlights again the preferential atrophy of slow-twitch muscle fibres.

Labelling of denervated muscle fibre

NCAM (CD56) is classically used to identify muscle fibres undergoing regeneration or denervation processes (Mosole *et al.* 2014; Arentson-Lantz *et al.* 2016). Our results revealed a small number of NCAM+ muscle fibres, mainly at the end of the DI period: a significant increase by 6-fold was reported ($P = 0.002$, Fig. 7A).

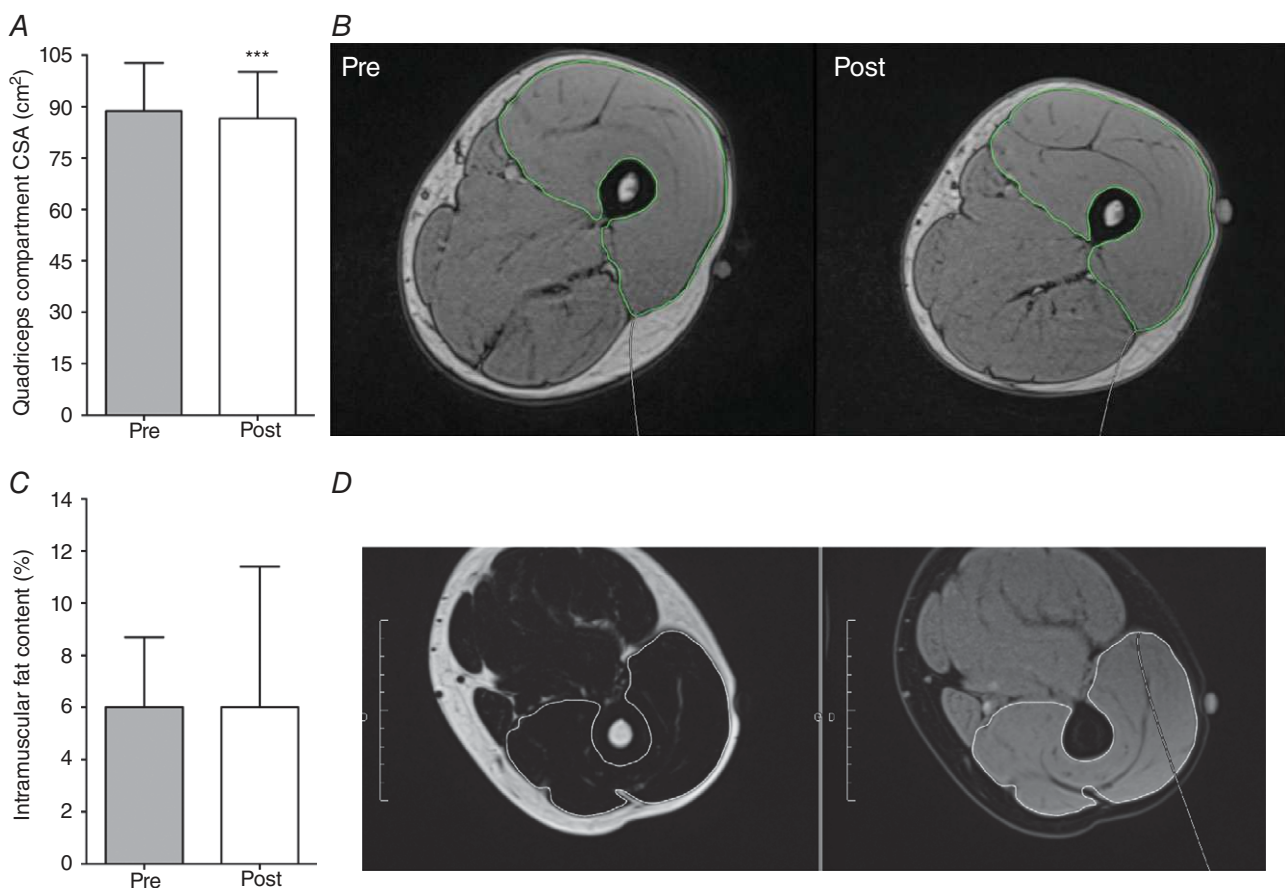


Figure 4. Magnetic resonance imaging (MRI) analysis of the thigh anterior compartment

A, measurements of the cross-sectional area (CSA, cm²) of the anterior compartment of the thigh before (grey bar) and after (white bar) 3 days of DI. B, MRI representing the quadriceps compartment CSA between the same subject pre- and post-DI. C, measurements of the fat content percentage of the anterior compartment of the thigh before (grey bar) and after (white bar) 3 days of DI. D, T1 Dixon axial water/fat concentration images. $N = 12$. *** $P < 0.001$: significantly different from pre-DI value. [Colour figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

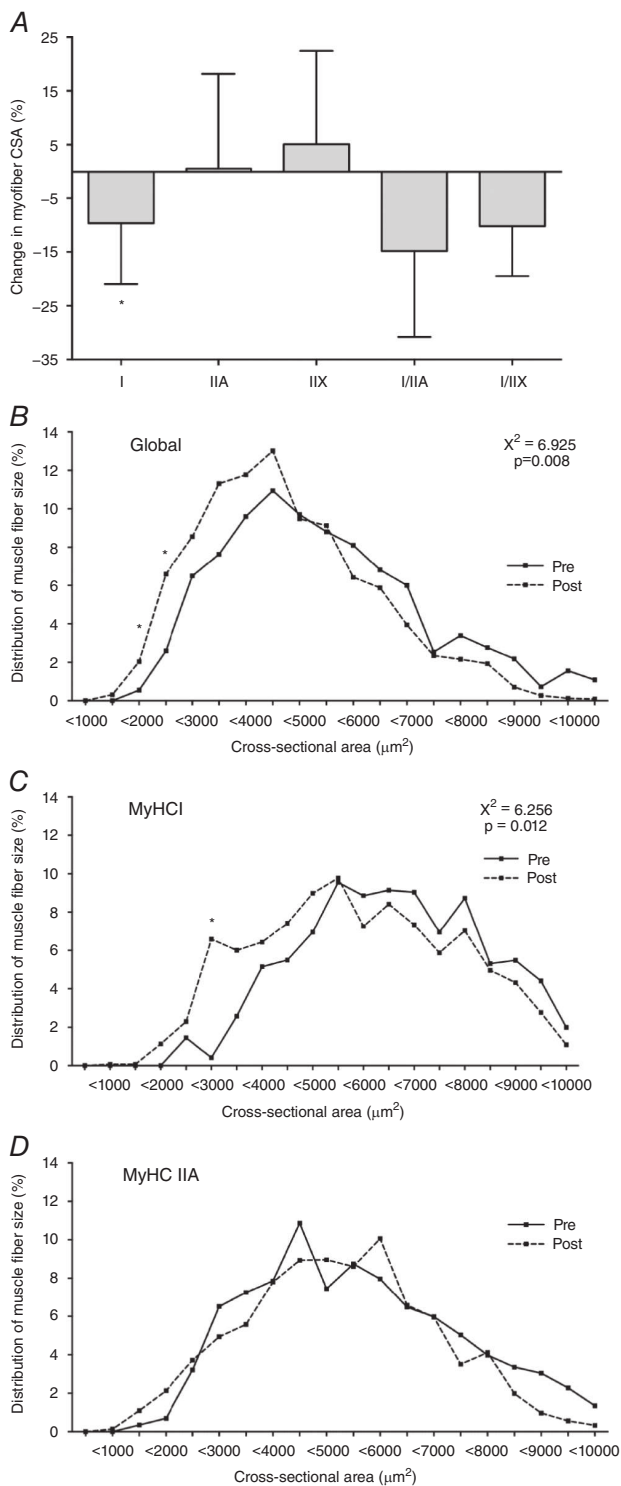


Figure 5. Mean fibre cross-sectional area (CSA) is decreased after 3 days of dry immersion (DI)
A, CSA changes of each fibre type in post- vs. pre-DI conditions. **B**, binned histogram representing the distribution of muscle fibre CSA before and at the end of the DI period. **C**, binned histogram representing the distribution of type I muscle fibre CSA. **D**, binned histogram representing the distribution of type IIA muscle fibre CSA. $N = 8$. * $P < 0.05$: significantly different from pre-DI value.

Discussion

Environmental situations associated with muscle disuse translate to an exponential decay in muscle mass, corresponding to major changes in the first days of disuse (Cros *et al.* 1999; Bodine *et al.* 2001). Therefore, the aim of the present study was to characterize the early events of muscle deconditioning of healthy adults to further optimize prevention strategies. Our results, from the first study performed in Europe using the dry immersion model, show the effects of a short-term 3-day period of hypoactivity on quadriceps muscle function and structure. The DI model is known to reproduce accurately the effects of microgravity on the musculoskeletal system more quickly than the head-down bed rest model. Moreover, to our knowledge, no previous study has investigated DI-induced muscle adaptations with complementary protocols using histology, MRI analysis, myometer and isokinetic ergometer measurements. Our study clearly shows that muscle disuse translates during the first 3 days to a decrease in quadriceps functional and structural properties.

Our results show that the extent of the quadriceps MVC strength loss was approximately 11%. A magnitude of about 15% loss was reported after 5 weeks head-down bed rest (Krainski *et al.* 2014), and also after 10-day clinical bed rest studies in older men (Kortebein *et al.* 2007, 2008). The literature globally reports a quadriceps MVC strength loss of up to 30% for 3-month bed rest (Alkner & Tesch, 2004b). Thus, DI experiments generate greater loss of strength than bed rest studies, but results are close to those of immobilization experiments in which muscle disuse is more severe. Using accurate mathematical modelling of both the contraction and relaxation phases, our results also show a decrease in the rate of force development (k_{ACT}) of 29% between pre- and post-DI data, in addition to modifications related to the relaxation phase. Indeed, the relaxation phase is biphasic (Stehle *et al.* 2002a,b; Tesi *et al.* 2002b; Poggesi *et al.* 2005), with a slow and linear force decay at first (slow rate k_{LIN} constant), followed by a fast exponential decay. Our results showed a longer slow rate constant phase post-DI, associated with a lower slope. The literature indicates that modifications related to the slow linear force decay may be associated with a decrease in inorganic phosphate concentrations, which could explain the slowing of the relaxation phase (Stehle *et al.* 2002a; Tesi *et al.* 2002a). k_{LIN} is also related to the myosin head detachment rate constant, which depends on the velocity of calcium uptake, confirming the role of calcium homeostasis in the alteration of the relaxation properties. Thus, beyond the specific maximal strength measurements, the original results of our study demonstrated altered contraction and relaxation kinetics induced by DI, with significant decreases in k_{ACT} , k_{REL} and k_{LIN} . Regarding contraction development, k_{ACT} depends on both the

cross-bridge isomerization rate constant (dependent on inorganic phosphate liberation) and the Ca^{2+} release velocity (i.e. Ca^{2+} transient). This was demonstrated in Py's study in 2015, in which a clear diminution in the Ca^{2+} muscle transient of flexor digitorum brevis muscle (similar to the extensor digitorum longus phenotype) was associated with clenbuterol (β_2 agonist) treatment (Py *et al.* 2015). This could contribute to the slower kinetics of muscle contraction and strongly suggests that dry immersion acts on some of the processes involved in excitation–contraction coupling, thereby modulating force and contractility characteristics, probably via an alteration in calcium handling.

Together with the decrease in muscle strength, we were able, using the Myoton tool, to report changes in mechanical properties of the quadriceps rectus femoris, reflecting changes in the contractile state of the muscle. The use of MyotonPro technology has been validated in different experiments to examine the tone and viscoelastic

properties of several individual superficial skeletal muscles (Aird *et al.* 2012; Schneider *et al.* 2015; Treffel *et al.* 2016a). Our results underlined changes in all three measured parameters. The decrease in the dynamic stiffness and the oscillation frequency associated with the increase in the logarithmic decrement demonstrates that the quadriceps muscle was significantly more relaxed during the DI condition. Indeed, as in experiments under microgravity conditions, the DI model induces a large decrease in tensioning force by suppressing mechanical load and external tensions (Schneider *et al.* 2015). Moreover, a previous study by Reschke and colleagues showed that muscle stretch reflex was decreased after microgravity exposure (Reschke *et al.* 2009). The decrease in muscle tone in our experiment could be related to another functional consequence of short-term DI, i.e. changes in postural pattern. Indeed, Treffel *et al.* recently showed an early altered postural pattern during recovery after DI disuse in the same experiment (Treffel *et al.* 2016a). Our

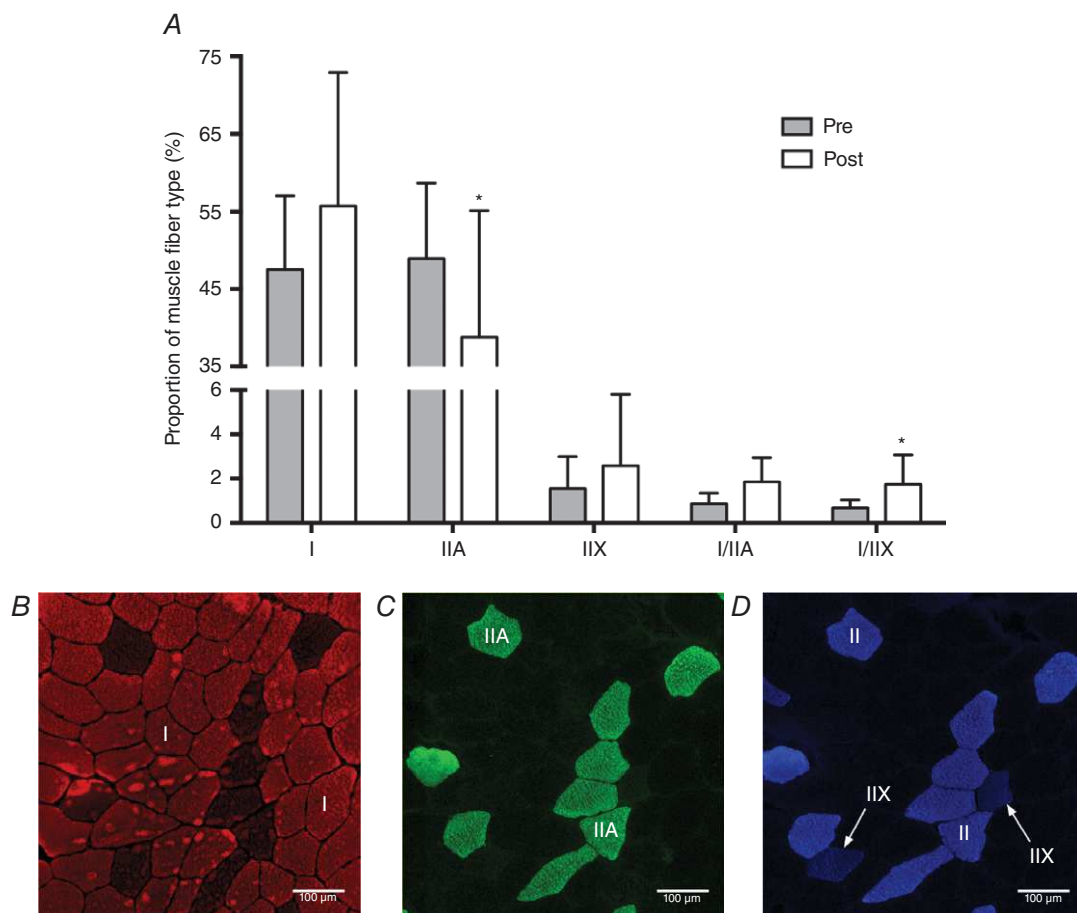


Figure 6. Changes of myotypology and fibre size after 3 days of dry immersion (DI)

A, proportion of muscle fibre type in pre- and post-DI conditions. *B*, representative immunohistological image with MyHC type I (red) labelling at the end of the DI period. Scale bar: 100 μm . *C*, representative immunohistological image with MyHC type IIA (green) labelling at the end of the DI period. Scale bar: 100 μm . *D*, representative immunohistological image with MyHC type II labelling at the end of the DI period. Scale bar: 100 μm . $N = 8$. * $P < 0.05$: significantly different from pre-DI value. [Colour figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

study has contributed to demonstrating the usefulness of this complementary tool through its use on the lower limb during DI; the device allowed us to collect data on muscle changes using non-invasive, cost-effective technology. As a tool that enables real-time assessment of muscle parameters, this technology is of great importance for simulated or real spaceflight experiments, as well as for sports performance or training follow-up, when invasive biopsies are not often possible, or not allowed for repeated measures.

In muscle disuse experiments, muscle CSA is generally evaluated using MRI analysis. Our results reported a decrease by 2% of the anterior compartment of the thigh. Once again, we can confirm that DI experiments are able to induce a greater decrease in muscle size than what is observed in bed rest experiments. For example, a 7-day bed rest was associated with a decrease of 3% of the anterior thigh CSA, 20-day bed rest with a decrease of

8%, 30-day with 10%, 60-day with 14%, and 90-day with 18% (Ferrando *et al.* 1995; Kawakami *et al.* 2001; Alkner & Tesch, 2004a; Mulder *et al.* 2006). These previous studies clearly highlight that muscle loss from disuse is defined by an exponential decay. Parallel to MRI measurements, muscle biopsies allowed us to investigate muscle disuse at the cellular level and to report a significant decrease of muscle fibre CSA by approximately 10%, mainly attributable to slow-twitch muscle fibres, which translates to an increased proportion of smaller fibres. Our results are in accordance with previous studies demonstrating that 3 days of DI can induce a fibre atrophy of 9%, and 7 days of DI, a fibre atrophy of approximately 18% (Litvinova *et al.* 2004; Navasiolava *et al.* 2011). Once again, this result highlights the magnitude of early, non-linear-early muscle decay. For comparison, a bed rest experiment reported a twofold muscle fibre atrophy (18%) after 6 weeks of hypoactivity (Berg *et al.* 1997). However, as mentioned before, our result was close to the degree of atrophy reported in immobilization experiment. A study by Suetta *et al.* (2012), for example, reported a 10% muscle fibre atrophy after only 4 days of cast immobilization (Suetta *et al.* 2012).

Changes in fibre myotypology are also classically reported in muscle disuse experiments, and we were able, after just 3 days of DI, to observe significant changes, i.e. a decrease in fibre IIA percentage, and an increase in the proportion of hybrid fibres co-expressing type I and IIX MyHC. This result illustrates that, in addition to preferential and early atrophy, type I fibres started to lose their specific slow-type, postural function and co-expressed early *de novo* type IIX MyHC. Thus, as demonstrated in the 1990s by Baldwin's group, short-term inactivity is able to negatively impact on transcription of the type I MyHC gene and to repress transcription of the IIA MyHC gene, thereby creating a switch from slow I/IIA to a fast IIX fibres, and explaining the observation of the increased percentage of type I/IIX hybrid fibres (Caiozzo *et al.* 1998; Baldwin *et al.* 2013). This result also emphasizes the importance and the role of histone biology and modifications in the early events of skeletal muscle disuse. Indeed, it has been demonstrated that during MyHC transition, histone H3 at the type I MyHC gene becomes de-acetylated in correspondence with down-regulation of that gene, while up-regulation of the fast IIX and IIB MyHC occurs in conjunction with enhanced H3ac in those MyHC genes. Enrichment of H3K4me3 is also increased at the type IIX and IIB MyHCs when these gene are induced by unloading stimuli. Down-regulation of the IIA MyHC gene, however, was not associated with a corresponding loss of H3ac or H3K4me3 (Pandorf *et al.* 2006). These changes in myotypology appear to be specific to the first days and weeks, disappearing after a longer duration of VL disuse. Indeed, the studies of Berg *et al.* (1997) and Chopard *et al.* (2005) did not report any changes in myotypology after

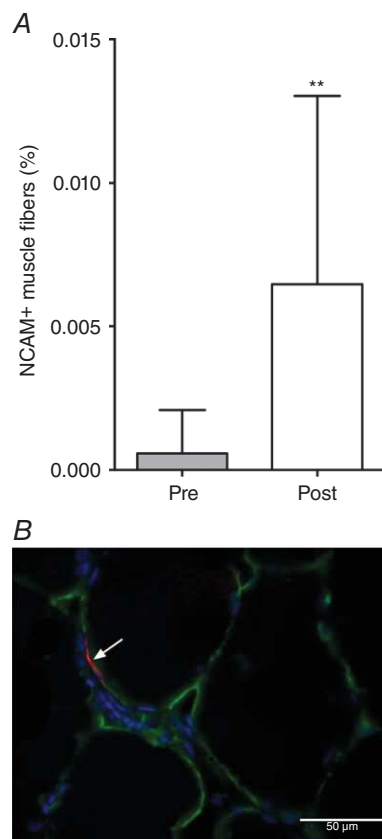


Figure 7. Increased proportion of NCAM+ muscle fibres after 3 days of dry immersion

A, quantification of NCAM+ fibres was expressed as the percentage of fibres positive for NCAM. B, representative image, 63× magnification in oil: the arrow indicates an NCAM/CD56+ muscle fibre (in red). Nuclei were identified with DAPI labelling (in blue), and muscle fibre with anti-laminin (in green), Scale bar: 50 μm. $N = 9$. ** $P < 0.01$: significantly different from pre-DI value. [Colour figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

6 weeks and 3 months of bed rest, respectively, (Berg *et al.* 1997; Chopard *et al.* 2005). At the cellular level, we also investigated the degree of muscle fibre denervation. Indeed, disuse experiments as well those examining the ageing process classically demonstrate that the magnitude of strength loss is higher than the degree of atrophy (Berg *et al.* 1997; Jubrias *et al.* 1997; di Prampero & Narici, 2003; Delmonico *et al.* 2009), and the denervation process is known to contribute to this discrepancy (Midrio, 2006). The study of Arentson-Lantz *et al.* (2016), for example, reported a significant increase in NCAM+ muscle fibres (from 2% to 4%) after 14 days of bed rest (Arentson-Lantz *et al.* 2016). Our results reported that only 3 days of DI induced a small but significant increase in the number of NCAM-positive myofibres, suggesting that loss of motor innervation may begin very early in the context of disuse, and indicating early changes in recruitment patterns.

Furthermore, aged muscle and denervated young muscle exhibit similar changes in myofibrillar properties (Ansved & Larsson, 1989). During ageing, the number of muscle fibres and motor units decreases in rodents and man (Caccia *et al.* 1979; Edstrom & Larsson, 1987). It has been suggested that the decreased number of muscle fibres is due to loss of entire motor units and incomplete reinnervation of denervated muscle fibres by the remaining motor neurons (Caccia *et al.* 1979; Edstrom & Larsson, 1987) resulting from impaired axonal regeneration in the aged rat (Drahota & Gutmann, 1961). The increased levels of NCAM in aged skeletal muscle reported in these studies support this assumption.

Our study contributes to the characterization of the early signatures of muscle disuse. This information is of major importance for the development of accurate exercise and nutrition countermeasures to be implemented before and during space flight, clinical bed rest, and immobilization to prevent the early initiation of exponential muscle decay.

References

- Adams GR, Caiozzo VJ & Baldwin KM (2003). Skeletal muscle unweighting: spaceflight and ground-based models. *J Appl Physiol* (1985) **95**, 2185–2201.
- Agyapong-Badu S, Aird L, Bailey L, Mooney K, Mullix J, Warner M, Samuel D & Stokes M (2013). Interrater reliability of muscle tone, stiffness and elasticity measurements of rectus femoris and biceps brachii in healthy young and older males. *Working Papers in the Health Sciences* **1**, 2051–6266.
- Aird L, Samuel D & Stokes M (2012). Quadriceps muscle tone, elasticity and stiffness in older males: reliability and symmetry using the MyotonPRO. *Arch Gerontol Geriatr* **55**, e31–39.
- Alkner BA & Tesch PA (2004a). Efficacy of a gravity-independent resistance exercise device as a countermeasure to muscle atrophy during 29-day bed rest. *Acta Physiol Scand* **181**, 345–357.
- Alkner BA & Tesch PA (2004b). Knee extensor and plantar flexor muscle size and function following 90 days of bed rest with or without resistance exercise. *Eur J Appl Physiol* **93**, 294–305.
- Ansved T & Larsson L (1989). Effects of ageing on enzyme-histochemical, morphometrical and contractile properties of the soleus muscle in the rat. *J Neurol Sci* **93**, 105–124.
- Arentson-Lantz EJ, English KL, Paddon-Jones D & Fry CS (2016). Fourteen days of bed rest induces a decline in satellite cell content and robust atrophy of skeletal muscle fibers in middle-aged adults. *J Appl Physiol* (1985) **120**, 965–975.
- Baldwin KM, Haddad F, Pandorf CE, Roy RR & Edgerton VR (2013). Alterations in muscle mass and contractile phenotype in response to unloading models: role of transcriptional/pretranslational mechanisms. *Front Physiol* **4**, 284.
- Belavy DL, Miokovic T, Armbrecht G & Felsenberg D (2013). Hypertrophy in the cervical muscles and thoracic discs in bed rest? *J Appl Physiol* (1985) **115**, 586–596.
- Berg HE, Larsson L & Tesch PA (1997). Lower limb skeletal muscle function after 6 wk of bed rest. *J Appl Physiol* (1985) **82**, 182–188.
- Bergstrom J (1975). Percutaneous needle biopsy of skeletal muscle in physiological and clinical research. *Scand J Clin Lab Invest* **35**, 609–616.
- Bodine SC, Latres E, Baumhueter S, Lai VK, Nunez L, Clarke BA, Poueymirou WT, Panaro FJ, Na E, Dharmarajan K, Pan ZQ, Valenzuela DM, DeChiara TM, Stitt TN, Yancopoulos GD & Glass DJ (2001). Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. *Science* **294**, 1704–1708.
- Brioche T, Pagano AF, Py G & Chopard A (2016). Muscle wasting and aging: Experimental models, fatty infiltrations, and prevention. *Mol Aspects Med* **50**, 56–87.
- Caccia MR, Harris JB & Johnson MA (1979). Morphology and physiology of skeletal muscle in aging rodents. *Muscle Nerve* **2**, 202–212.
- Caiozzo VJ, Baker MJ & Baldwin KM (1998). Novel transitions in MHC isoforms: separate and combined effects of thyroid hormone and mechanical unloading. *J Appl Physiol* (1985) **85**, 2237–2248.
- Chopard A, Arrighi N, Carnino A & Marini JF (2005). Changes in dysferlin, proteins from dystrophin glycoprotein complex, costameres, and cytoskeleton in human soleus and vastus lateralis muscles after a long-term bedrest with or without exercise. *FASEB J* **19**, 1722–1724.
- Chopard A, Hillock S & Jasmin BJ (2009). Molecular events and signalling pathways involved in skeletal muscle disuse-induced atrophy and the impact of countermeasures. *J Cell Mol Med* **13**, 3032–3050.
- Chuang LL, Wu CY & Lin KC (2012). Reliability, validity, and responsiveness of myotonometric measurement of muscle tone, elasticity, and stiffness in patients with stroke. *Arch Phys Med Rehabil* **93**, 532–540.

- Cros N, Muller J, Bouju S, Pietu G, Jacquet C, Leger JJ, Marini JF & Dechesne CA (1999). Upregulation of M-creatine kinase and glyceraldehyde3-phosphate dehydrogenase: two markers of muscle disuse. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **276**, R308–R316.
- Delmonico MJ, Harris TB, Visser M, Park SW, Conroy MB, Velasquez-Mieyer P, Boudreau R, Manini TM, Nevitt M, Newman AB, Goodpaster BH, Health A & Body (2009). Longitudinal study of muscle strength, quality, and adipose tissue infiltration. *Am J Clin Nutr* **90**, 1579–1585.
- Dietsch AM, Solomon NP, Sharkey LA, Duffy JR, Strand EA & Clark HM (2014). Perceptual and instrumental assessments of orofacial muscle tone in dysarthric and normal speakers. *J Rehabil Res Dev* **51**, 1127–1142.
- di Prampero PE & Narici MV (2003). Muscles in microgravity: from fibres to human motion. *J Biomech* **36**, 403–412.
- Drahota Z & Gutmann E (1961). The influence of age on the course of reinnervation of muscle. *Gerontologia* **5**, 88–109.
- Edstrom L & Larsson L (1987). Effects of age on contractile and enzyme-histochemical properties of fast- and slow-twitch single motor units in the rat. *J Physiol* **392**, 129–145.
- Ferrando AA, Stuart CA, Brunder DG & Hillman GR (1995). Magnetic resonance imaging quantitation of changes in muscle volume during 7 days of strict bed rest. *Aviat Space Environ Med* **66**, 976–981.
- Fitts RH, Riley DR & Widrick JJ (2000). Physiology of a Microgravity Environment Invited Review: Microgravity and skeletal muscle. *J Appl Physiol* (1985) **89**, 823–839.
- Fitts RH, Trappe SW, Costill DL, Gallagher PM, Creer AC, Colloton PA, Peters JR, Romatowski JG, Bain JL & Riley DA (2010). Prolonged space flight-induced alterations in the structure and function of human skeletal muscle fibres. *J Physiol* **588**, 3567–3592.
- Gavronski G, Veraksits A, Vasar E & Maaros J (2007). Evaluation of viscoelastic parameters of the skeletal muscles in junior triathletes. *Physiol Meas* **28**, 625–637.
- Ikai M & Fukunaga T (1968). Calculation of muscle strength per unit cross-sectional area of human muscle by means of ultrasonic measurement. *Int Z Angew Physiol* **26**, 26–32.
- Jackman RW & Kandarian SC (2004). The molecular basis of skeletal muscle atrophy. *Am J Physiol Cell Physiol* **287**, C834–C843.
- Jubrias SA, Odderson IR, Esselman PC & Conley KE (1997). Decline in isokinetic force with age: muscle cross-sectional area and specific force. *Pflugers Arch* **434**, 246–253.
- Kawakami Y, Akima H, Kubo K, Muraoka Y, Hasegawa H, Kouzaki M, Imai M, Suzuki Y, Gunji A, Kanehisa H & Fukunaga T (2001). Changes in muscle size, architecture, and neural activation after 20 days of bed rest with and without resistance exercise. *Eur J Appl Physiol* **84**, 7–12.
- Kawashima S, Akima H, Kuno SY, Gunji A & Fukunaga T (2004). Human adductor muscles atrophy after short duration of unweighting. *Eur J Appl Physiol* **92**, 602–605.
- Kortebein P, Ferrando A, Lombeida J, Wolfe R & Evans WJ (2007). Effect of 10 days of bed rest on skeletal muscle in healthy older adults. *JAMA* **297**, 1772–1774.
- Kortebein P, Symons TB, Ferrando A, Paddon-Jones D, Ronsen O, Protas E, Conger S, Lombeida J, Wolfe R & Evans WJ (2008). Functional impact of 10 days of bed rest in healthy older adults. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* **63**, 1076–1081.
- Kovanlikaya A, Guclu C, Desai C, Becerra R & Gilsanz V (2005a). Fat quantification using three-point Dixon technique: in vitro validation. *Acad Radiol* **12**, 636–639.
- Kovanlikaya A, Mittelman SD, Ward A, Geffner ME, Dorey F & Gilsanz V (2005b). Obesity and fat quantification in lean tissues using three-point Dixon MR imaging. *Pediatr Radiol* **35**, 601–607.
- Krainiski F, Hastings JL, Heinicke K, Romain N, Pacini EL, Snell PG, Wyrick P, Palmer MD, Haller RG & Levine BD (2014). The effect of rowing ergometry and resistive exercise on skeletal muscle structure and function during bed rest. *J Appl Physiol* (1985) **116**, 1569–1581.
- Litvinova KS, Vikhlyantsev IM, Kozlovskaya IB, Podlubnaya ZA & Shenkman BS (2004). Effects of artificial support stimulation on fiber and molecular characteristics of soleus muscle in men exposed to 7-day dry immersion. *J Gravit Physiol* **11**, P131–132.
- Manini TM, Clark BC, Nalls MA, Goodpaster BH, Ploutz-Snyder LL & Harris TB (2007). Reduced physical activity increases intermuscular adipose tissue in healthy young adults. *Am J Clin Nutr* **85**, 377–384.
- Marcus RL, Addison O, Kidde JP, Dibble LE & Lastayo PC (2010). Skeletal muscle fat infiltration: impact of age, inactivity, and exercise. *J Nutr Health Aging* **14**, 362–366.
- Midrio M (2006). The denervated muscle: facts and hypotheses. A historical review. *Eur J Appl Physiol* **98**, 1–21.
- Mosole S, Carraro U, Kern H, Loeffler S, Fruhmans H, Vogelauer M, Burggraf S, Mayr W, Krenn M, Paternostro-Sluga T, Hamar D, Cvecka J, Sedliak M, Tirpakova V, Sarabon N, Musaro A, Sandri M, Protasi F, Nori A, Pond A & Zampieri S (2014). Long-term high-level exercise promotes muscle reinnervation with age. *J Neuropathol Exp Neurol* **73**, 284–294.
- Mulder ER, Stegeman DF, Gerrits KH, Paalman MI, Rittweger J, Felsenberg D & de Haan A (2006). Strength, size and activation of knee extensors followed during 8 weeks of horizontal bed rest and the influence of a countermeasure. *Eur J Appl Physiol* **97**, 706–715.
- Narici MV & de Boer MD (2011). Disuse of the musculo-skeletal system in space and on earth. *Eur J Appl Physiol* **111**, 403–420.
- Navasiolava NM, Custaud MA, Tomilovskaya ES, Larina IM, Mano T, Gauquelin-Koch G, Gharib C & Kozlovskaya IB (2011). Long-term dry immersion: review and prospects. *Eur J Appl Physiol* **111**, 1235–1260.
- Pandorf CE, Haddad F, Roy RR, Qin AX, Edgerton VR & Baldwin KM (2006). Dynamics of myosin heavy chain gene regulation in slow skeletal muscle: role of natural antisense RNA. *J Biol Chem* **281**, 38330–38342.
- Pavy-Le Traon A, Heer M, Narici MV, Rittweger J & Vernikos J (2007). From space to Earth: advances in human physiology from 20 years of bed rest studies (1986–2006). *Eur J Appl Physiol* **101**, 143–194.
- Poggesi C, Tesi C & Stehle R (2005). Sarcomeric determinants of striated muscle relaxation kinetics. *Pflugers Arch* **449**, 505–517.
- Pruyn EC, Watsford ML & Murphy AJ (2015). Validity and reliability of three methods of stiffness assessment. *J Sport Health Sci* **5**, 476–483.

- Py G, Ramonatxo C, Sirvent P, Sanchez AM, Philippe AG, Douillard A, Galbes O, Lionne C, Bonniou A, Chopard A, Cazorla O, Lacampagne A & Candau RB (2015). Chronic clenbuterol treatment compromises force production without directly altering skeletal muscle contractile machinery. *J Physiol* **593**, 2071–2084.
- Reschke MF, Bloomberg JJ, Paloski WH, Mulavara AP, Feiveson AH & Harm DL (2009). Postural reflexes, balance control, and functional mobility with long-duration head-down bed rest. *Aviat Space Environ Med* **80**, A45–54.
- Schiaffino S, Dyar KA, Ciciliot S, Blaauw B & Sandri M (2013). Mechanisms regulating skeletal muscle growth and atrophy. *FEBS J* **280**, 4294–4314.
- Schneider S, Peipsi A, Stokes M, Knicker A & Abeln V (2015). Feasibility of monitoring muscle health in microgravity environments using Myoton technology. *Med Biol Eng Comput* **53**, 57–66.
- Smith SM, Zwart SR, Block G, Rice BL & Davis-Street JE (2005). The nutritional status of astronauts is altered after long-term space flight aboard the International Space Station. *J Nutr* **135**, 437–443.
- Stehle R, Kruger M & Pfitzer G (2002a). Force kinetics and individual sarcomere dynamics in cardiac myofibrils after rapid Ca^{2+} changes. *Biophys J* **83**, 2152–2161.
- Stehle R, Kruger M, Scherer P, Brixius K, Schwinger RH & Pfitzer G (2002b). Isometric force kinetics upon rapid activation and relaxation of mouse, guinea pig and human heart muscle studied on the subcellular myofibrillar level. *Basic Res Cardiol* **97** (Suppl. 1), I127–135.
- Suetta C, Frandsen U, Jensen L, Jensen MM, Jespersen JG, Hvid LG, Bayer M, Petersson SJ, Schroder HD, Andersen JL, Heinemeier KM, Aagaard P, Schjerling P & Kjaer M (2012). Aging affects the transcriptional regulation of human skeletal muscle disuse atrophy. *PLoS One* **7**, e51238.
- Tesi C, Colomo F, Piroddi N & Poggesi C (2002a). Characterization of the cross-bridge force-generating step using inorganic phosphate and BDM in myofibrils from rabbit skeletal muscles. *J Physiol* **541**, 187–199.
- Tesi C, Piroddi N, Colomo F & Poggesi C (2002b). Relaxation kinetics following sudden Ca^{2+} reduction in single myofibrils from skeletal muscle. *Biophys J* **83**, 2142–2151.
- Trappe SW, Trappe TA, Lee GA, Widrick JJ, Costill DL & Fitts RH (2001). Comparison of a space shuttle flight (STS-78) and bed rest on human muscle function. *J Appl Physiol* (1985) **91**, 57–64.
- Treffel L, Dmitrieva L, Gauquelin-Koch G, Custaud MA, Blanc S, Gharib C & Millet C (2016a). Craniomandibular system and postural balance after 3-day dry immersion. *PLoS One* **11**, e0150052.
- Treffel L, Mkhitarian K, Gellee S, Gauquelin-Koch G, Gharib C, Blanc S & Millet C (2016b). Intervertebral disc swelling demonstrated by 3D and water content magnetic resonance analyses after a 3-day dry immersion simulating microgravity. *Front Physiol* **7**, 605.

Additional information

Competing interests

The authors declare that they have no conflict of interest.

Author contributions

R.D., L.T., G.P., T.B., A.P., M.P.B., A.B., L.P., R.C., C.G., A.C., C.M. contributed to the acquisition, analysis, or interpretation of data for the work, revised the manuscript critically for important intellectual content and approved the final version of the manuscript. All authors agreed to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved. R.D., L.T., G.P., T.B., A.P., M.P.B., A.B., L.P., R.C., C.G., A.C., and C.M. are designated authors qualifying for authorship, and all those who qualify for authorship are listed.

Funding

This study was funded by The French ‘Centre National d’Etudes Spatiales’ (CNES).

Acknowledgements

We thank the MEDES staff (Toulouse, France), and Professors Jacques Mercier and Maurice Hayot for their excellent biopsy procedures. We thank Karen Mkhitarian and Stéphane Gelée for their invaluable help in the MRI investigation. We also thank Élodie Jublanc for her help in the histology investigation and for all her advice; and especially the subjects for their participation in this project.

Translational perspective

Identification of cost-effective interventions to maintain muscle mass, muscle strength, and physical performance is a major public health challenge. Our experiment focuses on the early muscle weakness induced by only 3 days of inactivity. The significant structural and functional muscle changes reported in our study highlight the sensitivity of our locomotor muscles to the absence of activity. Accordingly, these results have a real impact in clinical situations involving inactivity, even if the duration of bed rest or immobilization is short, and should therefore contribute to the design of specific pre-conditioning programmes to avoid the early muscle weakness. These pre-conditioning programmes should be related to exercise, nutrition and pharmacological methods, and should be considered an important field of current scientific investigation.

**CHAPITRE 3 : Évaluation d'une contremesure
lors de deux protocoles de réduction d'activité
prolongée**

Préambule

Afin de prévenir et limiter les effets indésirables du déconditionnement musculaire décrits juste au-dessus, de nombreuses contre mesures nutritionnelles et/ou à base d'exercice ont été proposées dans la littérature. En effet, la nutrition et l'exercice sont de puissants stimuli permettant de positiver la balance protéique et limiter ainsi la perte de masse musculaire. Toujours dans le cadre des expérimentations menées par le CNES afin de prévenir le déconditionnement musculaire lié à l'impesanceur, deux études ont été réalisées à MEDES avec une contre mesure nutritionnelle. Une première expérimentation a permis de tester la contre mesure dans le cadre d'une réduction modérée d'activité puis dans un deuxième temps lors d'un alitement prolongé.

Certaines recherches plus détaillées concernant l'inactivité physique ont été menées à l'aide d'expérimentations d'alitement prolongé pour étudier les adaptations physiologiques des astronautes (Hargens & Vico, 2016). Ces études menées au cours des 60 dernières années ont démontré que l'alitement prolongé allant de 3 jours et jusqu'à 120 jours entraîne, entre autres, une diminution de la dépense énergétique, une diminution de la capacité aérobie et une perte de force et de masse musculaire, et une perte osseuse (Hargens & Vico, 2016). Parallèlement, une diminution de la sensibilité à l'insuline se produit avec des modifications métaboliques et une accumulation de graisse ectopique (Bergouignan et al., 2011; Kenny et al., 2017b).

Les études sur les sujets âgés supplémentés en nutriments ont montré des améliorations de la synthèse des protéines et de la sensibilité à l'insuline. En outre, les études sur la suspension des membres postérieurs démontrent que la supplémentation en vitamine E réduit l'inflammation et augmente la biogenèse mitochondriale et la sensibilité à l'insuline (Momken *et al.*, 2011). Les résultats ont montré des effets convaincants, même s'il est peu probable qu'un micronutriment unique soit suffisamment puissant pour inverser les effets néfastes de l'inactivité physique.

Les objectifs de cette double expérimentation étaient multiples. Dans un premier temps, le protocole de réduction d'activité a servi d'étalonnage et de base permettant l'utilisation de la contre mesure lors de l'alitement prolongé pour vraiment tester son efficacité. Le protocole d'alitement prolongé nous a offert une formidable opportunité de caractériser les effets du déconditionnement musculaire sur du long terme, à savoir ici 60 jours. Les changements phénotypiques ainsi que l'étude des voies signalétiques impliquées dans la balance protéique et la mitochondriogenèse ont été explorés. Cette étude a permis la rédaction d'un article

original en collaboration dans la revue The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism (en soumission).

1. Présentation des protocoles expérimentaux

1.1. Le protocole de réduction d'activité de 20 jours

Vingt sujets masculins actifs et sains ont participé à l'étude. Ils ont été affectés à l'un des deux groupes comparés: i) 1 groupe Contrôle (n = 10) et ii) - 1 groupe de Cocktail (n = 10) avec une dose quotidienne de 530 mg du cocktail XXS-2A (3 comprimés / jour); 138 mg de vitamine E (1 pilule / jour) et 2,1 g d'oméga-3 (3 comprimés / jour) répartis aux trois repas. Les capsules ont été prises à l'heure des repas pour réduire les risques d'effets secondaires qui affectent la zone gastro-intestinale (Figure 54).

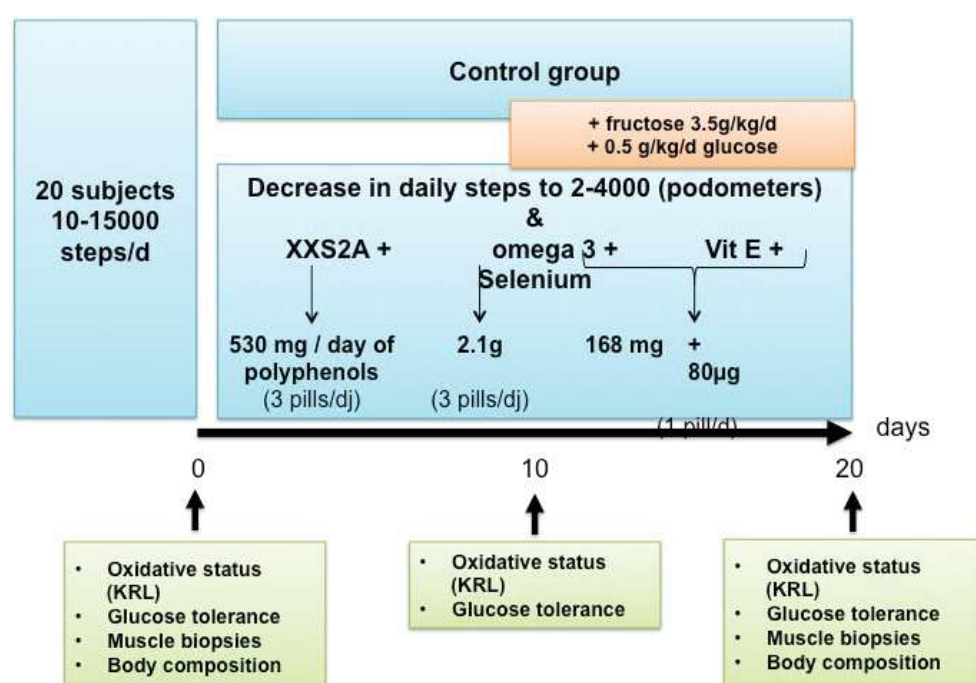


Figure 54 - Protocole expérimental de la prise du cocktail durant la réduction d'activité

Au cours des 20 jours en vie libre, les sujets des deux groupes ont été invités à réduire considérablement les pas quotidiens en dessous de 2500 s'ils le pouvaient (mais pas plus de 5000). Les 10 derniers jours, ils ont eu une supplémentation de fructose (3 g / kg / j) et du glucose (0,5 g / kg / j) dans l'alimentation. L'addition de glucose vise à augmenter l'absorption du fructose afin de limiter les effets de l'insulino-résistance dans l'organisme. Pour évaluer l'absorption de fructose, un échantillon de matières fécales a été collecté à chaque visite au MEDES.

Les sujets sont venus trois fois à la clinique spatiale MEDES pour les tests: i) le premier jour (V 1, visite de base), ii) le dixième jour (V 2), iii) le vingtième jour (V 3) pour la dernière

évaluation. La conception générale de l'étude est schématiquement présentée ci-après (Figure 55).

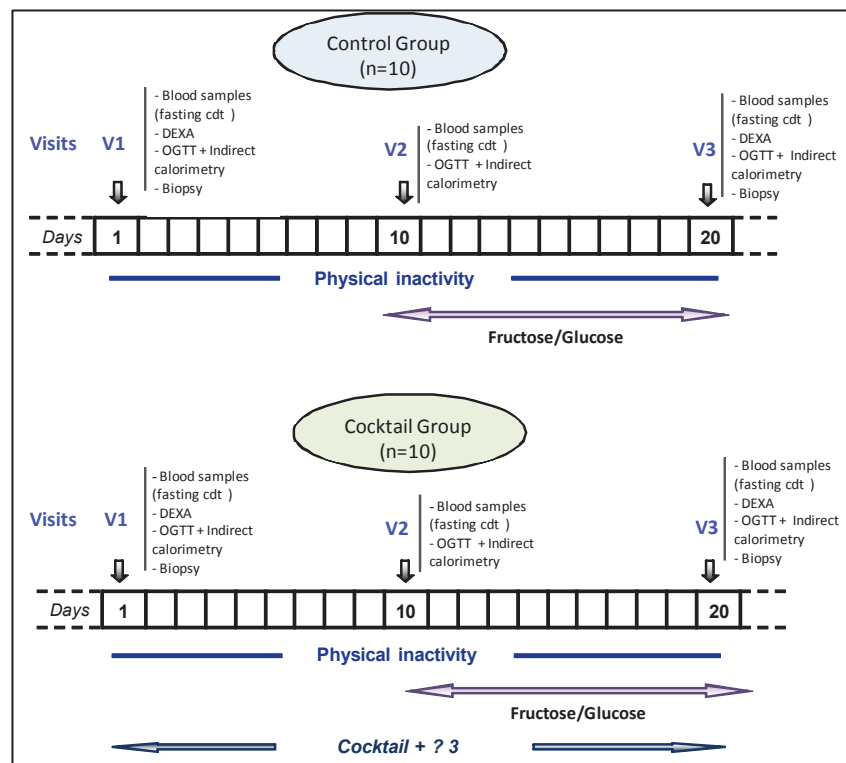


Figure 55 - Protocole expérimental de la réduction d'activité de 20 jours

1.2. Chronogramme de l'expérimentation

Au cours des 20 jours, les sujets devaient réduire considérablement l'activité physique des loisirs et les pas quotidiens en dessous de 2500. L'activité physique des sujets a été évaluée pendant les 20 jours avec deux podomètres / actimètres portés sur le poignet non dominant (ActiGraph GT9X Link) et sur la hanche (wGT3X +, Actigraph USA). Les données du GT9X Link ont été communiquées quotidiennement aux enquêteurs par SMS pour assurer la conformité au protocole. Au cours des 10 derniers jours, l'alimentation des sujets a été complétée par l'ajout de fructose (3 g / kg / j) et de glucose (0,5 g / kg / j).

1.3. Protocole d'alitement prolongé de 60 jours :

La première campagne d'alitement prolongé s'est déroulée de Janvier 2017 à Avril 2017 (Figure 56). Afin de permettre une logistique rigoureuse, les sujets débutaient le protocole par paire de façon décalée d'une journée.

Les sujets ont été accueillis 2 semaines avant le début du protocole. Cette période a été utilisée pour effectuer les différents tests et évaluations avant l'alitement (période BDC : Baseline Data Collection).

L'alitement prolongé avec déclivité de -6° durant 60 jours a commencé à HDT0 pour se terminer à R+0, jour du relevé. Une période de 2 semaines de réambulation a été prévue pour les sujets avant leurs départs pour des séances de réathlétisation.

Des biopsies musculaires ont été effectuées 6 jours avant le début de l'alitement prolongé correspondant au point de cinétique « Pré » ; au 56^{ème} jour de l'alitement (HDT56) correspondant au point de cinétique « Post ». Enfin, une biopsie musculaire a été effectuée 10 jours après le relevé des sujets (R+10) correspondant au point de cinétique « R+10 ».



Figure 56 - Protocole du bedrest de 60 jours

1.4. Extrait du chronogramme du protocole expérimental de l'alitement prolongé

Ci-après, le détail précis du chronogramme de la prise en charge des sujets de leur arrivée à la clinique spatiale jusqu'au 8^{ème} jour avant le début de l'alitement prolongé (Figure 57).

De manière stricte, les urines des sujets ont été recueillies tous les matins, suivi de prises de sang. Le petit-déjeuner a été pris quotidiennement à 7h30, le déjeuner a été programmé à 12h30 chaque jour ; enfin le dîner à 19h30. À BDC-12, les sujets effectuaient les différents tests de force et notamment la contraction maximale isométrique volontaire du quadriceps. Ce point de cinétique correspondait au point de référence (PRE) de chaque sujet. L'effet du protocole expérimental concernant ce test de force a été effectué quelques heures seulement après le relevé afin d'avoir les effets de l'alitement. Il correspond ainsi au point POST. Le protocole d'alitement a débuté à 9h00 au jour dit HDT1 et s'est achevé à la même heure 60 jours plus tard, soit HDT60. Il est important de noter qu'une biopsie musculaire a été

effectuée avant le début de l'alitement à BDC-6. Cette biopsie du *Vastus Lateralis* de la jambe droite correspondait au point de cinétique dit Pré. Le point de cinétique dit Post a été effectué au 56^{ème} jour de l'alitement (HDT56). Enfin une biopsie musculaire permettant de caractériser la phase de récupération a été effectuée 10 jours après le début de la phase de réambulation (R+10). À ces mêmes temps, une biopsie de gras sous-cutané a également été effectuée.

BDC-14	BDC-13	BDC-12	BDC-11	BDC-10	BDC-9	BDC-8
URINES	URINES	URINES Δ	URINES Δ	URINES** et ***	URINES***	URINES
TRU-CO (20')	Blood	Blood	Blood	Blood		Blood
BCD-DEXA-BC(30)	STA-VAS			BLA-Lipid Test		STA-VAS
RMR	STA-CEC (1h30-2h)	BLAB-St test		24h		STA-CEC (1h30-2h)
BCD-DGI (16')						
BCD-Posturo (16')						
TAG					REY-SVS (1h)	
sûche virtuelle (1h) training					BLAB-St test	
BCD-3DpQCT(1h)		BCD-MVC (1h30)			CAI-Hol ECG	BCD-VO2max (1h)
	MRI (80') (Trudef+ Metabolism)	BCD-Fatigue			STA-CBT début (35h)	CAI-Hol ECG
	TRU-Selles	ARC-SL-EEG	ARC-SL-EEG	BCD-Quest (16')	THO-CGMS+prick (35h)	
		THO-CGMS+prick	THO-CGMS+prick	THO-CGMS+prick	THO-CGMS+prick	THO-CGMS+prick
ARC-AW+Quest	ARC-AW+Quest	ARC-AW+Quest	ARC-AW+Quest	ARC-AW+Quest	ARC-AW+Quest	ARC-AW+Quest

Figure 57 – Extrait du chronogramme détaillé du protocole expérimental de l'alitement prolongé de 60 jours

Présentation d'un extrait du chronogramme détaillé des sujets pendant leurs séjours à la clinique spatiale. Chaque expérimentation est identifiée par un créneau horaire spécifique. Cette organisation est stricte et ne peut être modifiée.

De nombreux tests ont été effectués en amont, pendant et après la période d'alitement prolongé (suivi DEXA, tests de cognition, suivi psychologique, test de réalité virtuelle, échographies cardiaques, suivi calorimétrique, suivis IRM, etc).

Il est à noter que lors de leur séjour à la clinique, les sujets ont eu l'opportunité d'échanger avec l'astronaute français Thomas PESQUET. Un souvenir immortalisé sur la Figure 58 ci-après.



Figure 58 - Photo issue d'une communication avec les 10 sujets de l'alitement prolongé de 60 jours à Toulouse avec Thomas PESQUET lors de sa mission spatiale

2. Les conditions de participation aux études expérimentales

Concernant l'éthique et les critères d'inclusion/exclusion de l'étude, ils sont identiques aux deux études d'hypoactivité. Ils sont décrits ci-après. La méthode de recrutement des sujets pour le protocole de réduction d'activité et décrit ci-après (Figure 59).

RECRUTEMENT ET SÉLECTION

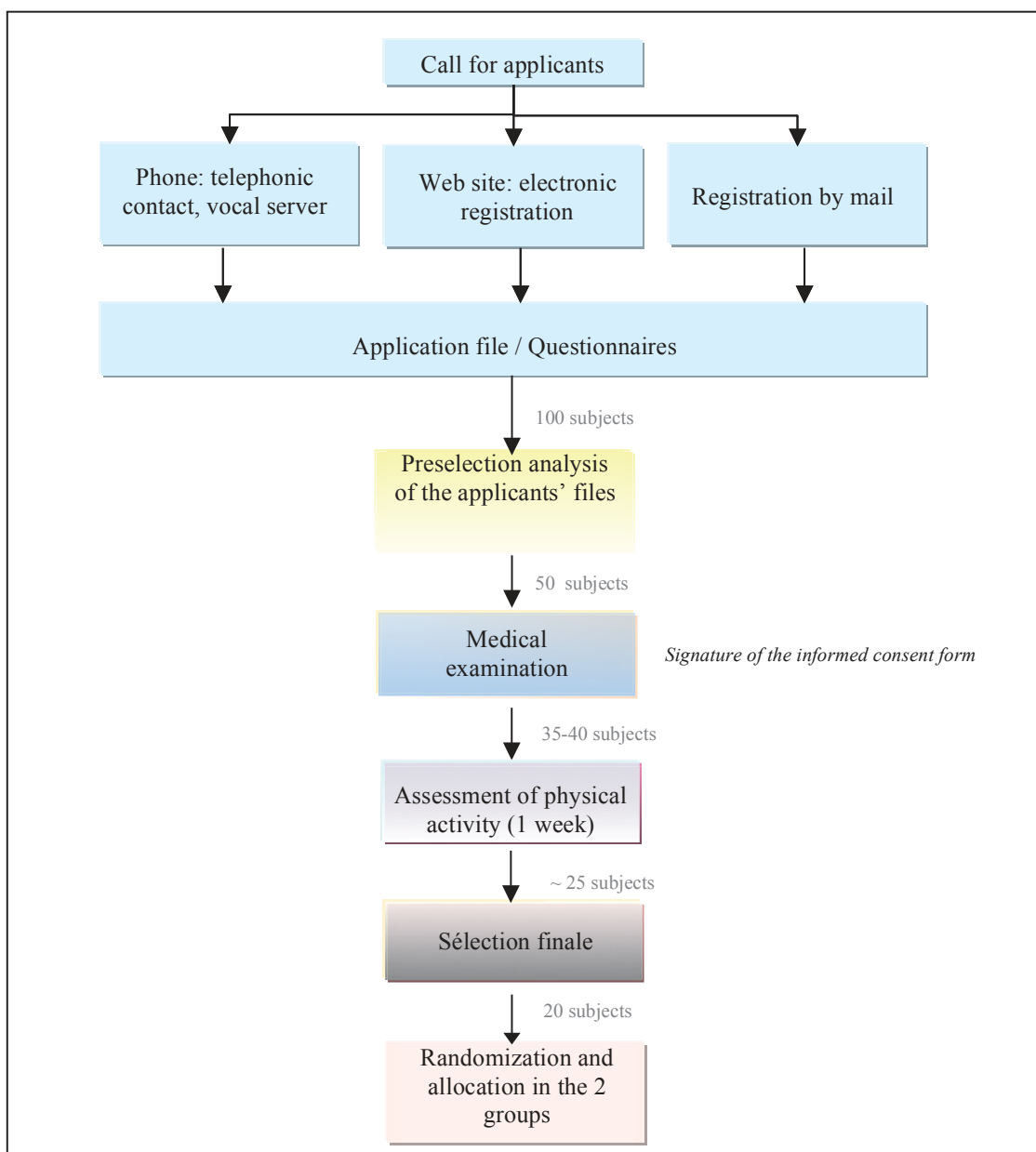


Figure 59 – Méthode de sélection des sujets

2.1. Les critères d'inclusion et exclusion du protocole de réduction d'activité et de l'alitement prolongé

2.1.1. Les critères d'inclusion de l'étude

L'étude a fait l'objet de précautions drastiques et non négociables. Pour les sujets, un certain nombre de critères devaient être respectés. En voici la liste. Concernant la situation

démographique et la santé des sujets, il fallait que les sujets **i)** soient masculins et en bonne santé, **ii)** soient âgés de 20 ans à 45 ans, **iii)** devaient ne pas présenter d'obésité ou de minceur excessive avec IMC (poids Kg / hauteur m²) entre 22 et 27, **iv)** devaient mesurer entre 158 et 190 cm, **v)** devaient être sains par une évaluation clinique complète (antécédents médicaux détaillés et examen physique complet): en particulier, sans aucune maladie chronique ou toute maladie infectieuse aiguë ou maladie d'ORL, neurologique, orthopédique, musculo-squelettique et cardiovasculaire, **vi)** correspondent à la tranche active de la population (10000 à 15000 pas / jour) ; **vii)** n'aient aucune contre-indication à lidocaïne, **viii)** ne présentent aucune allergie aux arachides ou au soja, **viii)** soient non-fumeur ou fument moins de 5 cigarettes / jour, **ix)** ne boivent pas d'alcool, ou ne présentent pas de toxicomanie et aucun traitement médical.

En terme de règlements particuliers, il a fallu être très stricte concernant le fait **i)** d'avoir donné un consentement éclairé par écrit avant toute procédure liée à l'étude, **ii)** s'assurer que le sujet soit couvert par le système d'assurance maladie, **iii)** s'assurer également que le sujet ne soit pas sous surveillance administrative ou juridique, **iv)** et enfin s'assurer que le sujet ne soit pas sous tutelle.

2.1.2. Les critères d'exclusion de l'étude

Tout comme les critères permettant de prétendre à participer à cette étude, de nombreux critères d'exclusion sont également à prendre en compte. En voici la liste. Concernant l'historique médicale et l'état clinique du sujet ; il ne fallait pas que les sujets **i)** présentent un historique ou présence de maladies cardiovasculaires, neurologiques ou ORL cliniquement pertinentes, toute maladie chronique; toute maladie infectieuse aiguë ; **ii)** Les sujets ne devaient pas présenter de signe d'obésité ou de minceur excessive, **iii)** les sujets ne devaient pas figurer dans la tranche inactive de la population (<10000 pas / jour), **iv)** les sujets ne devaient pas présenter de traitement médical en cours, **v)** les sujets ne devaient pas présenter de problèmes de coagulation du sang, **vi)** les sujets ne devaient pas, après avoir administré du sang (plus de 8 traitement médical en cours, **v)** les sujets ne doit pas présenter de mauvaise tolérance à l'échantillonnage du sang, **vi)** les sujets ne devaient, après avoir administré du sang (plus de 8 ml / kg) dans une période de 8 semaines ou moins avant le début de l'expérience, **vii)** les sujets ne devaient pas présenter de contre-indication à lidocaïne, **viii)** les sujets ne devaient pas avoir de régime alimentaire spécial, végétarien ou végétalien ou complément alimentaire, **ix)** les sujets ne devaient pas présenter d'historique en terme

d'allergie alimentaire, en particulier l'allergie aux arachides ou au soja, **x**) les sujets ne devaient pas être positifs aux tests suivants: HVA IgM (hépatite A), antigène HB (hépatite B), anticorps anti-HVC (hépatite C), anticorps anti-VIH1 + 2, Enfin les sujets ne devaient pas avoir d'historique ou une présence d'abus de drogue ou d'alcool (consommation d'alcool > 40 grammes / jour).

Des conditions générales étaient à respecter. Tout d'abord **i**) les sujets qui, selon le jugement de l'enquêteur, était susceptible d'être non conforme à l'étude ou incapable de coopérer en raison d'un problème de langue ou d'un mauvais développement mental, **ii**) si les sujets avaient reçu plus de 4500 euros dans les 12 mois pour être un sujet de recherche, **iii**) si les sujets ne pouvaient pas être contactés en cas d'urgence **iv**) si les sujets avaient un historique d'incarcérations, **v**) où alors si les sujets étaient soumis à la tutelle administrative.

3. Données anthropométriques et répartition des participants

3.1. Données anthropométriques du protocole de réduction d'activité de 20 jours

Les données anthropométriques des vingt sujets du protocole de réduction d'activité sont répertoriées dans le Tableau 8 ci-contre.

L'âge, la taille, le poids, l'indice de masse corporelle (IMC) ainsi que l'attribution du groupe de chaque sujet est indiqué au sein de ce tableau. De manière globale, les sujets sont âgés de 33 ans \pm 8 ans; ils mesuraient 179 cm \pm 6 cm. Ils pesaient 77,5 kg \pm 7,0 kg, et avaient un IMC moyen de 24,2 \pm 1,6.

Sujets	Âge	Taille (cm)	Poids	IMC	Groupe
A	28	189	84,1	23,54	cocktail
B	32	178	76,3	24,08	Contrôle
C	36	184	85,0	25,11	Contrôle
D	40	184	87,3	25,79	Cocktail
E	22	176	71,4	23,05	Cocktail
F	23	175	74,6	24,36	Contrôle
G	31	174	71,4	23,58	Cocktail
H	35	177	72,4	23,11	Contrôle
I	23	174	80,8	26,69	Contrôle
J	34	177	78,3	24,99	Cocktail
K	37	176	67,9	21,92	Contrôle
L	42	167	71,5	25,64	Cocktail
M	33	174	73,6	24,31	Cocktail
N	45	184	89,7	26,49	Contrôle
O	40	177	72,1	23,01	Cocktail
P	30	181	73,2	22,34	Contrôle
Q	23	180	70,4	21,73	Contrôle
R	27	177	86,3	27,55	Cocktail
S	44	172	68,9	23,29	Cocktail
T	45	181	84,4	25,76	Contrôle
Moyenne ± SD	32,9 ± 7,6	179 ± 5,0	77,5 ± 6,9	24,2 ± 1,6	N = 20

Tableau 8 - Données anthropométriques des sujets du protocole de réduction d'activité de 20 jours

Age, taille, poids de corps, indice de masse corporel et indication du groupe des sujets avant le protocole expérimental de 20 jours de réduction d'activité.

3.2. Données anthropométriques des 10 sujets participant à la première session d'alitement prolongé de 60 jours

Les données anthropométriques des dix sujets de la première session de l'alitement prolongé de 60 jours sont répertoriées dans le Tableau 9. L'âge, la taille, le poids, l'indice de masse corporelle (IMC) ainsi que l'attribution du groupe de chaque sujet est indiqué au sein de ce tableau. De manière globale, les sujets étaient âgés de 34 ans ± 8 ans; mesuraient 176cm ± 6cm. Ils pesaient 74,4 kg ± 7,3 kg et avaient un IMC moyen de 23,8 ± 1,4.

Sujets	Âge	Taille (cm)	Poids (kg)	IMC	Groupe
A	41	174	67,3	22,2	Cocktail
B	29	184	74,5	22,0	Cocktail
C	20	184	84,0	24,8	Contrôle
D	42	169	65,0	22,7	Contrôle
E	42	181	84,9	25,9	Contrôle
F	36	175	75,3	24,6	Cocktail
G	44	181	83,2	25,4	Cocktail
H	25	172	69,0	23,3	Contrôle
I	39	168	70,7	25,0	Cocktail
J	41	176	70,4	22,7	Contrôle
Moyenne ± SD	34 ± 8	176 ± 6	74.4 ± 7.3	23.8 ± 1.4	5 vs. 5

Tableau 9 - Données anthropométriques des 10 sujets participants à la première session de l'alitement prolongé de 60 jours

Age, taille, poids de corps, indice de masse corporel et répartition des groupes avant le protocole expérimental de 60 jours d'alitement prolongé.. N=10, répartis en deux groupes : Contrôle et Cocktail.

4. Méthodologie des deux protocoles expérimentaux

4.1. Biopsies musculaires et immunohistochimie

Un morceau de muscle d'environ 30 à 40 mg issu de la biopsie musculaire et destiné à l'analyse immunohistochimique était inclus dans un tube en silicone enrobé d'un tissu protecteur type OCT-TissueTek, l'ensemble plongé dans l'isopentane refroidi par l'azote liquide (-196°C) durant une minute. Cette association permet non seulement de solidifier l'ensemble, mais aussi de chasser le liquide intracellulaire grâce à l'isopentane pendant la congélation. Cette procédure permet de congeler le muscle tout en préservant les structures cellulaires. Des coupes de sections transversales, de 10 µm d'épaisseur, du *Vastus Lateralis* étaient réalisées à l'aide d'un cryostat à la température de -25°C (HM-560, Microm H) et déposée sur lame. Avant l'étape d'immunomarquage, les coupes étaient séchées et fixées pendant 10 minutes dans de l'acétone à température ambiante. Les coupes étaient rincées 4 x 5 minutes dans du PBS (Phosphate Buffer Saline) avant d'être perméabilisées et saturées avec un mélange de Triton (0,1%) et sérum de cheval (20%). Pour l'immunomarquage permettant de déterminer la surface de section globale des fibres, l'anticorps primaire anti-laminine était déposé pendant 1 heure à 37°C sur les coupes (Anti-laminin, L9393, Sigma-Aldrich; 1:200). Après avoir rincé au PBS, l'anticorps secondaire était déposé 1 heure à 37°C (ALEXA 488, A11029, Invitrogen, 1:800). Les coupes étaient ensuite séchées et montées avec du permafluor et stockées à 4°C dans le noir jusqu'à leur visualisation.

Les coupes de sections transversales, 10 µm d'épaisseur, du *Vastus Lateralis* étaient obtenues à l'aide d'un cryostat à la température de -25°C (HM-560, Microm H) et déposées sur lame. Avant l'étape d'immunomarquage, les coupes étaient séchées et fixées pendant 10 minutes dans de l'acétone à température ambiante. Les coupes étaient rincées dans du PBS (Phosphate Buffer Saline) à multiples reprises avant d'être perméabilisées et saturées avec un mélange de Triton (0,1%) et de sérum de cheval (20%). Les immunomarquages des isoformes de chaînes lourdes de myosine (MyHC) étaient réalisés en déposant l'anticorps primaire pendant 1 heure à 37°C sur les coupes (Tableau 10). Après avoir rincé au PBS, l'anticorps secondaire était déposé 1 heure à 37°C (1 :10). Pour finir, un intercalant permettant de visualiser les noyaux en bleu (Hoechst, 1 :1000) était également ajouté avant le montage au permafluor des lames avec une lamelle. Les fibres marquées par NCAM/CD56 ont été repérées manuellement sur les échantillons globaux. Les images ont été prises avec un microscope à épifluorescence inversée Axiovert 200M (Zeiss) à un grossissement de 63× à l'huile. La caméra utilisée pour prendre des photos était une CCD Kappa.

	Anticorps primaire	Référence	Dilution	Anticorps secondaire	Dilution
Aire de section	Anti-Laminine	L9393, Sigma	1 :200	Alexa 488	1 :800
Myotypologie	MyHC I	BA-D5,DSHB	1 :10	Alexa 568	1 :800
	MyHC II	M4276,Sigma	1 :200	Alexa 488	1 :800
	MyHC IIA	SC-71,DSHB	1 :10	Alexa 568	1 :800
	Hoechst		1 :1000		

Tableau 10 - Liste des anticorps utilisés pour le marquage des isoformes MyHC

4.2. Extraction et quantification de l'expression protéique

Pour procéder à l'extraction protéique, le muscle était broyé mécaniquement au potter dans un tampon de lyse (1/10 poids/volume ; 50mM Tris pH 7.5, 150mM NaCl, 1mM EGTA, 1mM EDTA, 1% Triton x-100, 100mM NaF, 5mM Na₃VO₄, 40mM β-glycérophosphate, 1% SDS, et d'un cocktail d'inhibiteurs de protéases). L'homogénat était ensuite centrifugé à 4°C pendant 10 minutes à 10000g, puis le surnageant était récupéré. Les protéines totales des échantillons ont été quantifiées avec la méthode BCA (BiCinchoninic acid Assay).

Les protéines ont ensuite été dénaturées en présence de tampon Laemmly (composition 5x : 250mM de Tris Base pH 6,8, 10% SDS, 25% β -mercaptoéthanol, 0,1% de

bromophenol blue et 50% de glycérol) puis séparées par migration par électrophorèse (80 à 200V) sur un gel à gradient de polyacrylamide en conditions dénaturantes (Mini-PROTEAN TGX Stain-Free Precast Gels 4-20%, Biorad). Puis, les protéines ont été transférées grâce au Trans-Blot Turbo Transfer System (Biorad) depuis le gel vers des membranes de nitrocellulose (Format midi 0,2µm, Biorad). Après l'étape de transfert, il est essentiel de bloquer les sites d'interactions non spécifiques entre les membranes et les anticorps en incubant pendant 1h à température ambiante les membranes dans une solution de TBS contenant 5% de lait écrémé et 0,1% de Tween 20. Les membranes étaient ensuite incubées à 4°C toute la nuit sous agitation avec des anticorps primaires Enfin, les membranes étaient incubées pendant 1h à température ambiante avec les anticorps secondaires (anti-mousse, anti-rabbit, anti-goat, respectivement au 1/4000, Santa Cruz) dirigés contre les anticorps primaires. La révélation des protéines d'intérêt était réalisée en utilisant un kit ECL (Pierce) et le ChemiDoc Touch (Biorad, Etats-Unis). Après la récupération des images depuis le ChemiDoc, la quantification des signaux était effectuée grâce au logiciel ImageLab (Biorad, Etats-Unis). Une normalisation des dépôts a été réalisée avec la quantité de protéines totales quantifiable grâce à la technologie « Stain Free » présente sur les gels utilisés. La liste des anticorps utilisés pour la quantification d'expression des protéines est résumée dans le Tableau 11 ci-après.

Anticorps	référence	Dilution	Fournisseur	Anticorps	référence	Dilution	Fournisseur
4E-BP1-p	2855		CeSig	MuRF-1	sc-27642	1/500	Santa Cruz
4E-BP1-t	9644		CeSig	P70S6K			
Akt ser ⁴⁷³	#4060	1/1000	CeSig	PGC1α	AB3242	1/1000	Millipore
Akt total	#9272	1/1000	CeSig	Rabbit	sc-2005	1/4000	Santa Cruz
Atrogin-1	AP2041	1/250	Biosciences	Rabbit	170-6515	1/10000	Biorad
Cox IV	GTX101499	1/500	Gentex	RPS6-p			
FABP4	#3544	1/500	CeSig	RPS6-t	#2317	1/500	CeSig
Lapin (Sec.)	Sc-2004	1/4000	Santa Cruz	Souris (Sec.)	Sc-2005	1/4000	Santa Cruz
MFN2	sc-30366	1/200	Santa Cruz	TRIM32	50555	1/500	ABCam
Mul-1	AB-84-061	1/500	ABCAM	Ubiquitine	sc-8017	1/3000	Santa cruz

Tableau 11 - Liste des anticorps utilisés dans l'étude d'alitement prolongé de 60 jours

5. Résultats des protocoles expérimentaux

5.1. Effets de la réduction d'activité

5.1.1. Augmentation de la masse grasse

Les données anthropométriques des sujets participant au protocole de réduction d'activité sont présentées dans les tableaux ci-contre (Tableau 12 et Tableau 13). De manière générale, on n'observe aucune différence significative de prise ou de perte de poids des sujets durant ce protocole que ce soit dans le groupe Contrôle (de 77,5 kg \pm 7,1 kg à 77,8 kg \pm 6,7 kg, N = 10, P = 0,20; Tableau 12) ou bien dans le groupe Cocktail (de 76,5 kg \pm 7,0 kg à 76,9 kg \pm 7,5 kg, N = 10, P = 0,21; Tableau 13).

Sujets N = 10	Âge	Taille (m)	Poids		IMC		Groupe
			Pré	Post	Pré	Post	
B	32	1,78	76,3	76,7	24,08	24,21	Contrôle
C	36	1,84	85,0	84,1	25,11	24,84	Contrôle
F	23	1,75	74,6	73,7	24,36	24,07	Contrôle
H	35	1,77	72,4	74,9	23,11	23,91	Contrôle
I	23	1,74	80,8	81,6	26,69	26,95	Contrôle
K	37	1,76	67,9	69,3	21,92	22,37	Contrôle
N	45	1,84	89,7	89,1	26,49	26,32	Contrôle
P	30	1,81	73,2	74,9	22,34	22,86	Contrôle
Q	23	1,80	70,4	69,1	21,73	21,33	Contrôle
T	45	1,81	84,4	84,4	25,76	25,76	Contrôle
Moyenne \pm SD	32,9 \pm 8,3	1,79 \pm 3,5	77,5 \pm 7,1	77,8 \pm 6,7	24,2 \pm 1,8	24,3 \pm 1,8	

Tableau 12 - Données anthropométriques des sujets Contrôle après 21 jours de réduction d'activité

Age, taille, poids de corps, indice de masse corporel et répartition des groupes avant le protocole expérimental de 21 jours de réduction d'activité.

De fait, aucune modification de l'indice de masse corporelle n'est également retrouvée aussi bien dans le groupe Contrôle (de 24,2 \pm 1,8 à 24,3 \pm 1,8, N = 10, P = 0,23; Tableau 12) que dans le groupe Cocktail (de 24,5 \pm 1,5 à 24,6 \pm 1,4, N = 10, P = 0,23; Tableau 13).

Sujets N = 10	Âge	Taille (m)	Poids		IMC		Groupe
			Pré	Post	Pré	Post	
A	28	1,89	84,1	86,2	23,54	24,13	Cocktail
D	40	1,84	87,3	89,8	25,79	26,52	Cocktail
E	22	1,76	71,4	71,3	23,05	23,02	Cocktail
G	31	1,74	71,4	71,3	23,58	23,55	Cocktail
J	34	1,77	78,3	78,5	24,99	25,06	Cocktail
L	42	1,67	71,5	70,4	25,64	25,24	Cocktail
M	33	1,74	73,6	75,0	24,31	24,77	Cocktail
O	40	1,77	72,1	73,6	23,01	23,49	Cocktail
R	27	1,77	86,3	84,3	27,55	26,91	Cocktail
S	44	1,72	68,9	68,4	23,29	23,12	Cocktail
Moyenne ± SD	34,1 ± 7,3	1,77 ± 6,1	76,5 ± 7,0	76,9 ± 7,5	24,5 ± 1,5	24,6 ± 1,4	N = 10

Tableau 13 – Données anthropométriques des sujets Cocktail après 20 jours de réduction d'activité

Age, taille, poids de corps, indice de masse corporel et répartition des groupes avant le protocole expérimental de 20 jours de réduction d'activité.

Si l'on s'intéresse à l'évolution du pourcentage de la masse grasse des sujets suite à la réduction d'activité de 20 jours, on s'aperçoit qu'il y a une interaction significative du paramètre « Temps » lors de ce protocole expérimental ($F=4,357$; $P < 0,001$). Ceci nous permet ainsi de comparer les différentes conditions aux différents groupes (par exemple Post-CTL vs. Post-CKT).

Nous observons tout d'abord une augmentation significative du pourcentage de masse grasse de $3,5\% \pm 1,4\%$ dans le groupe Contrôle (de $21,9\% \pm 1,4$ à $22,6\% \pm 1,3\%$, $N = 10$, $P < 0,05$; Figure 60). On retrouve également une augmentation significative du pourcentage de masse grasse dans l'organisme des sujets Cocktail avec une augmentation de $3,6\% \pm 1,2\%$ (de $23,4\% \pm 2,1\%$ à $24,1\% \pm 1,9\%$, $N = 10$, $P < 0,01$; Figure 60).

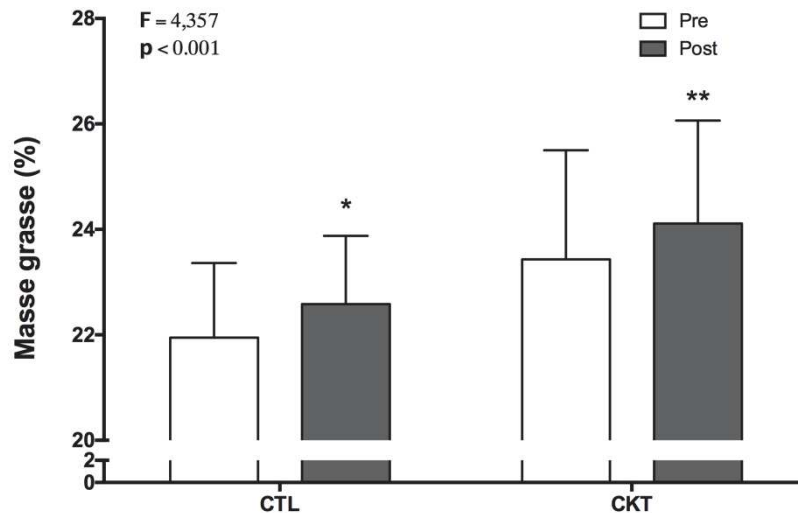


Figure 60 - Évolution du pourcentage de masse grasse après le protocole de réduction d'activité de 20 jours.

Pourcentage de masse grasse de l'organisme des sujets du groupe CTL (N=10) et CKT (N=10) avant (Pre) et après (Post) le protocole de réduction d'activité de 20 jours. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$ significativement différent de Pré.

5.2. Effets de l'alitement prolongé

5.2.1. Données anthropométriques

Les données anthropométriques des 10 sujets ayant participé à la première campagne d'alitement prolongé de 60 jours sont présentées dans les tableaux ci-après (Tableau 14 et Tableau 15). Il est primordial de noter que tous les sujets de l'étude ont effectué le protocole expérimental dans sa globalité ainsi que toutes les expérimentations souhaitées par les équipes scientifiques du projet, hormis un refus concernant une biopsie musculaire pendant la période de réambulation.

Sujets	Âge	Taille (cm)	Poids (kg)		IMC		Groupe
			Pré	Post	Pré	Post	
C	20	184	84,2	80,7	27,8	26,7	Contrôle
D	42	169	63,1	61,8	20,8	20,4	Contrôle
E	42	181	86,4	84,6	28,5	28,0	Contrôle
H	25	172	67,2	65,6	22,2	21,7	Contrôle
J	41	176	72,0	69,4	23,8	22,9	Contrôle
Moyenne	34,0 ± 10,7	176,4 ± 6,2	74,6 ± 10,3	72,4 ± 9,8**	24,6 ± 3,3	23,9 ± 3,2**	N=5

Tableau 14 - Données anthropométriques des sujets Contrôle de la première session d'alitement prolongé de 60 jours à Toulouse

Age, taille, poids de corps, indice de masse corporel avant (Pré), après (Post) des sujets du groupe « contrôle » ayant participé à l'alitement prolongé de 60 jours. *, $P < 0,05$; significativement différent de la condition Pré.

En effet, on observe une perte de poids significative de 3,0 % des sujets du groupe Contrôle entre le début et la fin de l'alitement (de 74,6 kg \pm 10,3 kg à 72,4 kg \pm 9,8 kg, N = 5, P = 0,003; Tableau 14; Pré vs. Post). De même, on observe la même différence significative concernant l'indice de masse corporel de ces sujets. Nous avons retrouvé une diminution globale et significative de 2,8 % du poids de corps des sujets du groupe Cocktail (de 75,7 kg \pm 5,8 kg à 73,6kg \pm 6,1 kg, N= 5, P = 0,004, Tableau 15). Ainsi de manière évidente et logique, l'indice de masse corporelle des sujets de l'étude a également diminué de façon significative.

Sujets	Âge	Taille (cm)	Poids (kg)		IMC		Groupe
			Pré	Post	Pré	Post	
A	41	174	68,2	66,2	22,5	21,9	Cocktail
B	29	184	76,3	72,1	25,2	23,8	Cocktail
F	36	175	78,0	75,9	25,7	25,1	Cocktail
G	44	181	83,6	82,5	27,6	27,2	Cocktail
I	39	168	72,3	71,2	23,9	23,5	Cocktail
Moyenne	37,8 \pm 5,7	176,4 \pm 6,3	75,7 \pm 5,8	73,6 \pm 6,1*	25,0 \pm 1,9	24,3 \pm 2,0*	N = 5

Tableau 15 - Données anthropométriques des sujets Cocktail de la première session d'alitement prolongé de 60 jours à Toulouse

*Age, taille, poids de corps, indice de masse corporel avant (Pré), après (Post) des sujets du groupe « cocktail » ayant participé à l'alitement prolongé de 60 jours. *, P<0,05 ; significativement différent de la condition Pré.*

5.2.2. Les effets de l'alitement prolongé sur le poids corporel des sujets

En analysant l'évolution du poids corporel des sujets de la première session sans distinction de groupe, on obtient une interaction significative concernant les 6 points de cinétique (Figure 61).

On observe une diminution significative et progressive du poids corporel des sujets à partir du 14^{ème} jour de l'alitement (HDT14) en comparaison au début de l'alitement (HDT1). Cette diminution de 1,5% à 14 jours (de 75,1 kg \pm 2,5 kg à 74,0 kg \pm 2,5 kg, N = 10, P = 0,001) se poursuit au 28^{ème} jour de l'alitement avec une diminution qui atteint 2,0% (de 75,1 kg \pm 2,5 kg à 73,6 kg \pm 2,4 kg, N = 10, P < 0,001). Cette diminution est maximale au 42^{ème} jour et le jour de relevé de l'alitement (HDT42 et R+0) puisqu'elle atteint 2,9% (de 75,1 kg \pm 2,5 kg à 72,9 kg \pm 2,4 kg, N = 10, P < 0,001 à HDT 42 et de 75,1 kg \pm 2,5 kg à 73,0 kg \pm 2,4 kg, N = 10, P = 0,001 ; R+0).

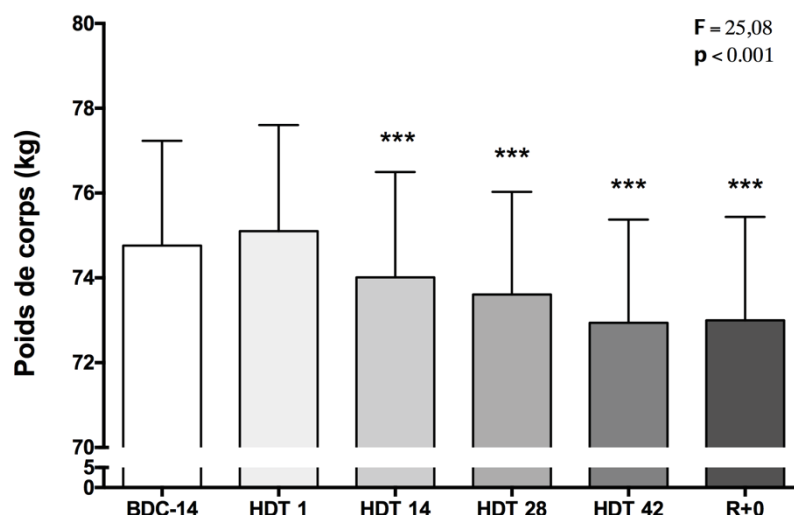


Figure 61 - Évolution du poids corporel durant l'alitement prolongé sur tous les sujets de la première session

Évolution du poids de corps des 10 sujets de l'alitement prolongé de 60 jours à leur arrivés à la clinique (BDC-14), au début de l'alitement (HDT 1), après 14 jours (HDT 14), 28 jours (HDT 28), 42 jours (HDT 42), après le premier jour du relevé (R+0). ***, $P < 0.001$ significativement différent de HDT-1

5.2.3. Effets de l'alitement prolongé sur l'évolution de la masse grasse

A l'inverse, on observe une augmentation significative du pourcentage de masse grasse des sujets de l'étude (Figure 62). Premièrement, on observe une diminution de 3,0% après les quinze premiers jours du protocole, correspondant à l'arrivée à la clinique et le début de l'alitement prolongé. Deuxièmement, dès le début du protocole on observe une augmentation légère mais non significative du pourcentage de masse grasse de 0,8% après seulement 4 jours d'alitement. Cette augmentation atteint +5,1% au 25^{ème} jour d'alitement ($p < 0.001$), +5,6% après le 39^{ème} jour d'alitement ($P < 0.001$), et enfin +9,7% au 58^{ème} jour de l'alitement prolongé ($P < 0.001$). En résumé, le pourcentage de masse grasse augmente d'environ 10% (de $25,7\% \pm 1,1\%$ avant le début du protocole expérimental jusqu'à $28,2\% \pm 1,1\%$ au 58^{ème} jour de l'alitement).

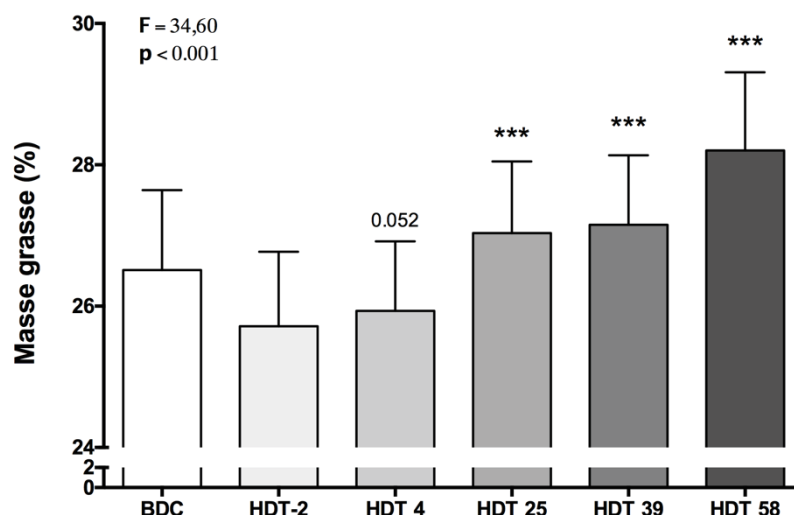


Figure 62 – Évolution du pourcentage de masse grasse durant l'alitement prolongé sur tous les sujets de la première session

Pourcentage de masse grasse des 10 sujets de l'alitement prolongé de 60 jours de leur arrivée à la clinique (BDC), avant le début de l'alitement (BDC-2), après 4 jours (HDT 4), 25 jours (HDT 25), 39 jours (HDT 39), avant le relevé (HDT 58). ***, $P < 0.001$ significativement différent de BDC. *** $P < 0.001$, significativement différent de HDT-2.

5.3. Évaluation du degré d'atrophie et de la myotypologie après 20 jours de réduction d'activité

5.3.1. Atrophie musculaire

L'aire de section des fibres musculaire a été mesurée par analyse morphométrique des coupes cryostat effectuées, immunomarquées avec l'anticorps anti-laminine issus des échantillons de biopsies musculaires du *Vastus Lateralis* pré et post-DI relatifs aux différents sujets composant l'étude (Figure 63).

Nous observons une diminution de 19,4% de l'aire de section des fibres musculaires du groupe « Contrôle » après la réduction d'activité de 20 jours (de $5308 \mu\text{m}^2 \pm 311 \mu\text{m}^2$ à $4277 \mu\text{m}^2 \pm 282 \mu\text{m}^2$, $p = 0.007$; $N = 10$). En revanche, nous n'observons aucune différence significative sur l'aire de section des fibres musculaires du groupe « Cocktail » (de $5073 \mu\text{m}^2 \pm 324 \mu\text{m}^2$ à $4705 \mu\text{m}^2 \pm 257 \mu\text{m}^2$) après réduction d'activité.

Si la CSA Pre entre les groupes Contrôle et Cocktail n'était pas différente, il apparaît une différence significative en fin de protocole : la CSA du groupe Cocktail était supérieure à celle du groupe Contrôle ($P < 0,05$) (Figure 63).

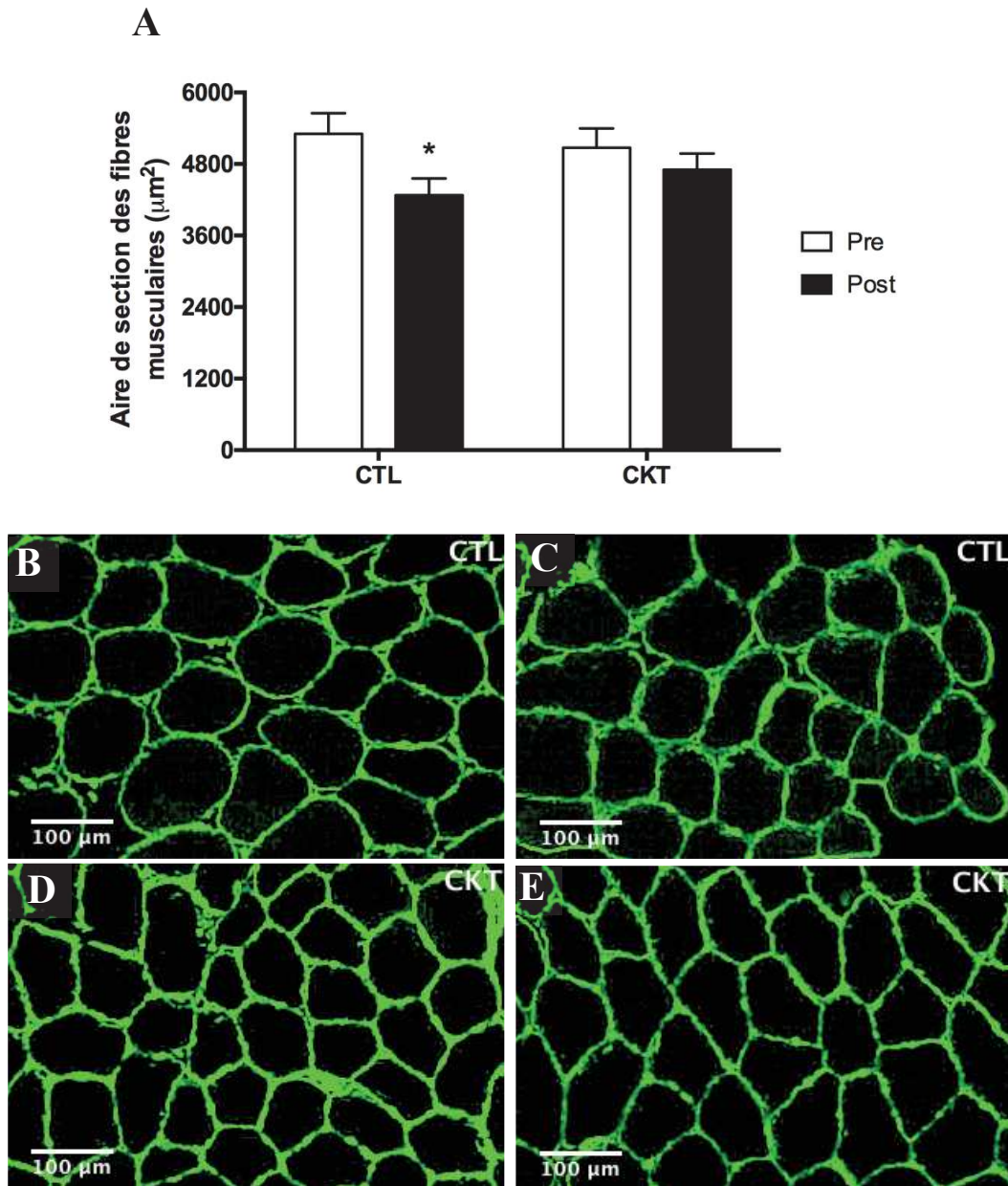


Figure 63 - Analyse morphométrique du degré d'atrophie

*A : Aires de section des fibres musculaires du groupe CTL et CKT avant (Pre) et après (Post) 21 jours de réduction d'activité. B-C-D-E : Immunomarquage de coupes musculaires avec l'anticorps anti-Laminine avant et après 20 jours de réduction d'activité. Échelle : 100 µm. *, Post vs. Pre, $p < 0.05$.*

5.3.2. Analyse de la distribution globale des fibres

Afin d'apporter plus de précisions sur l'analyse morphométrique, nous avons représenté les données selon un histogramme découpé par des intervalles en abscisse réguliers de la taille globale des fibres (500 µm). De fait, lorsque nous observons la répartition des fibres en fonction de leurs aires de section et sans distinctions de groupe (global, N=20), nous

observons un déplacement clair de l'aire de section des fibres vers la gauche ($\chi^2 = 7,113$; $P = 0,007$; $N=20$; Figure 64).

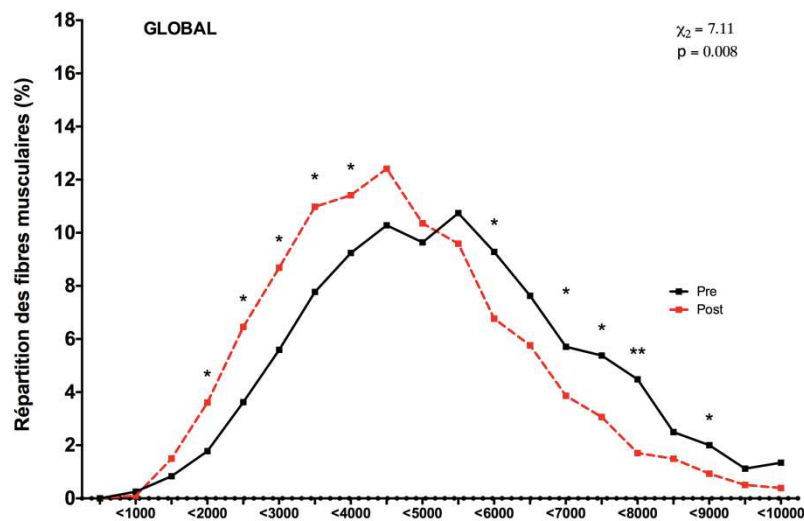


Figure 64 – Distribution globale des fibres musculaires avant et après 20 jours de réduction d'activité

Répartition des fibres musculaires de tous les sujets confondus en fonction de leurs surface de section réparties par intervalle de $500 \mu\text{m}^2$ avant (courbe noire, $N=20$) et après (courbe rouge, $N=20$) le protocole de réduction d'activité de 20 jours.

Ceci met donc en évidence une proportion accrue de fibres avec des aires de section plus petites (Figure 64). Ainsi pour les aires de section de fibres inférieures à $2000 \mu\text{m}^2$ jusqu'à $4000 \mu\text{m}^2$, on observe une proportion plus importante des fibres musculaires en condition « POST » indiquant un effet global de la réduction d'activité. Ceci se traduit en terme de pourcentage par une répartition des fibres musculaires s'élevant à 28,01% en condition Pré dans l'intervalle [$< 2000 \mu\text{m}^2$; $< 4000 \mu\text{m}^2$] ; tandis qu'en condition « Post » le pourcentage s'élève à 41,15%.

La représentation de la Figure 65 concerne uniquement la répartition de l'aire de section des fibres musculaires des sujets du groupe « Contrôle ». Le test du Chi-deux met en évidence un nombre plus important de fibres possédant une surface de section plus petite en condition Post par rapport à Pré ($\chi^2 = 14.42$; $P < 0.001$; $N=10$).

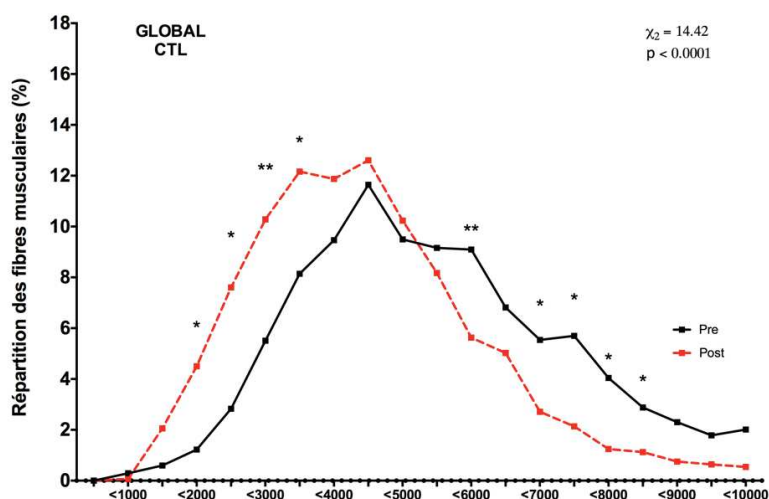


Figure 65 - Distribution globale des fibres musculaires avant et après 20 jours de réduction d'activité des sujets du groupe contrôle

Répartition des fibres musculaires des sujets « Contrôle » (CTL) en fonction de leur surface de section, répartie par intervalle de $500 \mu m^2$ avant (courbe noire, $N=10$) et après (courbe rouge, $N=10$) le protocole de réduction d'activité de 20 jours. * $P < 0.05$; ** $P < 0,01$: significativement différent de la moyenne Pre du même intervalle de taille.

A la différence, le test du Chi-deux effectué pour comparer les différences Pre/Post sur la répartition des fibres en fonction de leur surface de section, n'a pas permis de mettre en évidence une différence significative ($\chi^2 = 2,80$; $P = 0,09$; $N=10$, Figure 66). Ce qui suggérerait que la contre mesure prise par le groupe Cocktail a permis de limiter l'atrophie engendrer par la réduction d'activité.

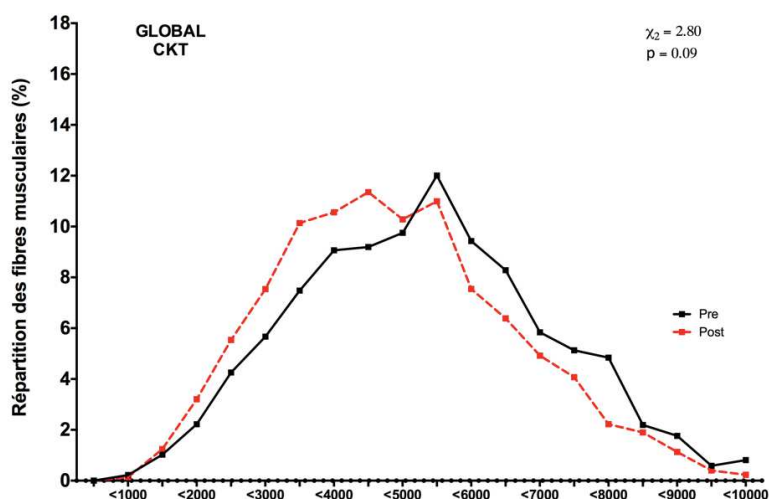


Figure 66 - Distribution globale des fibres musculaires avant et après 20 jours de réduction d'activité des sujets du groupe cocktail

Répartition des fibres musculaires des sujets « Cocktail » (Verduyck et al.) en fonction de leur surface de section répartie par intervalle de $500 \mu m^2$ avant (courbe noire, $N=20$) et après (courbe rouge, $N=20$) le protocole de réduction d'activité de 21 jours.

5.4. Évaluation de l'aire de section par types de fibres musculaires après 21 jours de réduction d'activité

5.4.1. Évaluation de la CSA des fibres de type 1

Si on s'intéresse à l'analyse de l'aire de section des fibres musculaires liée à l'expression de l'isoforme MyHC I, on observe une atrophie significative de -21,9% (pré: $5273 \pm 990 \mu\text{m}^2$, post: $4119 \pm 959 \mu\text{m}^2$; $P = 0,011$, Figure 67 A). A contrario ; aucune diminution significative n'a été observée sur ce même isoforme de MyHC pour le groupe « cocktail » (pré: $4968 \pm 1037 \mu\text{m}^2$, post: $4452 \pm 864 \mu\text{m}^2$; $P = 0,14$, Figure 67A).

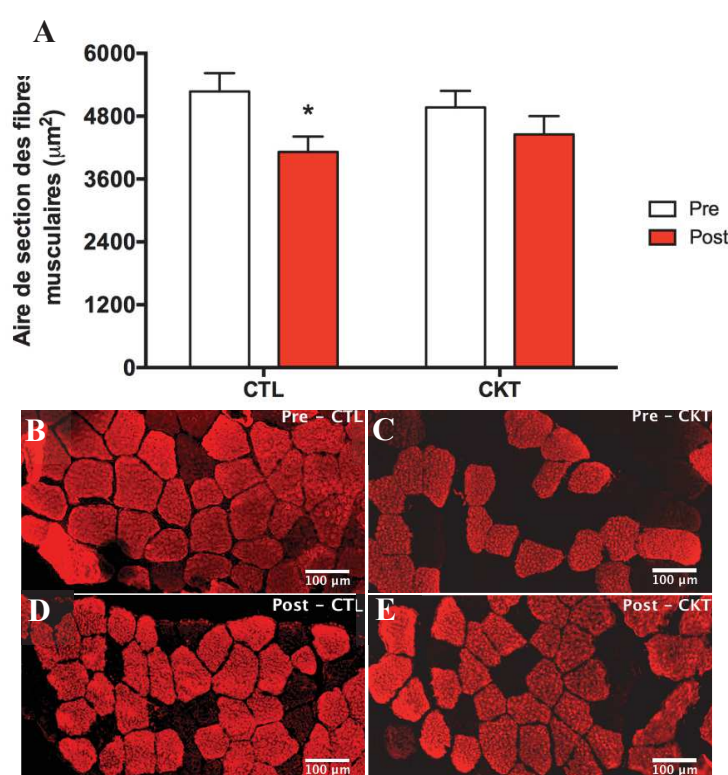


Figure 67 - Aire de section des fibres musculaires exprimant MyHC I du groupe Contrôle (CTL) et Cocktail (CKT)

*A : Aire de section des fibres musculaires exprimant MyHC I du groupe CTL et CKT avant (Pre) et après (Post) 3 jours d'immersion sèche. B-C-D-E : Immunomarquage des fibres musculaires exprimant MyHC I du groupe CTL et CKT avant et après 3 jours d'immersion sèche. Échelle : 100 μm. *, Post vs. Pre, $p < 0.05$.*

Étant donné la diminution de l'aire de section des fibres exprimant l'isoforme MyHC I, nous avons décidé de représenter la distribution de ces fibres, ainsi que les fibres MyHC II afin d'observer si l'atrophie d'environ 22% des fibres lentes est observée lorsqu'on les répartit en fonction de leurs aires de section.

5.4.2. Analyse de la distribution des fibres de type 1

La représentation de la Figure 68 concerne uniquement la répartition de l'aire de section des fibres musculaires exprimant l'isoforme MyHC I des sujets « Cocktail». Le test du Chi-deux met en évidence une augmentation du nombre de fibres de type I ayant une surface de section plus petite à l'issue du protocole chez les sujets du groupe « Cocktail» ($\chi^2 = 4,271$; $P = 0.039$; $N=10$). En effet, on observe sur la Figure 68 un léger décalage de la courbe « POST » vers la gauche indiquant une augmentation de la proportion de fibres musculaires plus petites.

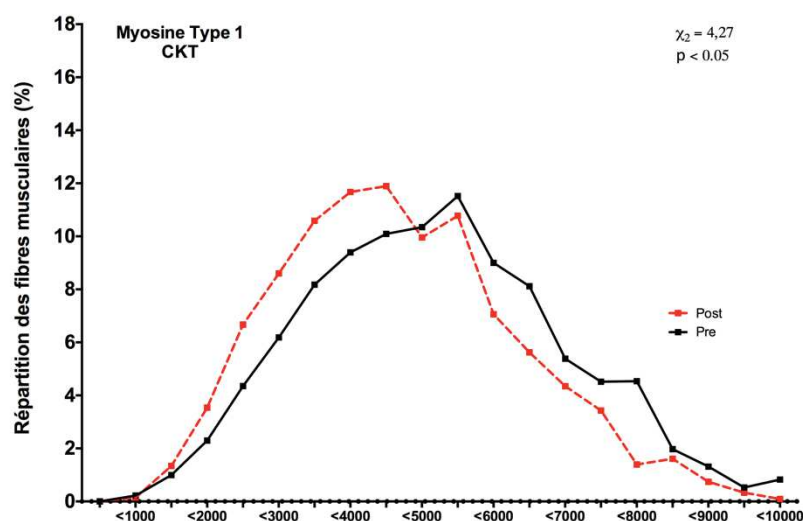


Figure 68 – Distribution des fibres musculaires de type 1 du groupe Cocktail

Répartition les fibres musculaires exprimant MyHC I des sujets du groupe « Cocktail» en fonction de leur taille, réparties par intervalle de $500 \mu\text{m}$ avant (courbe noire, $N=10$) et après (courbe rouge, $N=10$) le protocole de réduction d'activité de 20 jours.

La représentation de la Figure 69 concerne uniquement la répartition de l'aire de section des fibres musculaires exprimant MyHC I des sujets du groupe « Contrôle». De la même manière que précédemment, le test du Chi-deux met en évidence une augmentation du nombre de fibres de type I ayant une surface de section plus petite à l'issue du protocole chez les sujets du groupe « Contrôle» ($\chi^2 = 18.63$; $P < 0.001$; $N=10$). En effet, on observe sur la Figure 69 un décalage de la courbe « POST » vers la gauche indiquant une augmentation de la proportion de fibres musculaires plus petites.

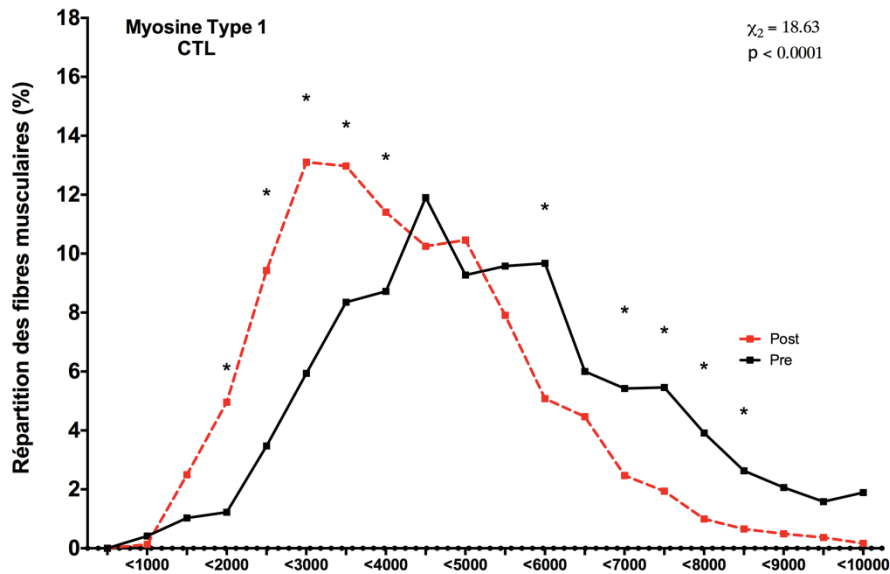


Figure 69 – Distribution des fibres musculaires de type 1 du groupe Contrôle

Répartition des fibres musculaires exprimant MyHC I des sujets du groupe « Contrôle » en fonction de leur taille, réparties par intervalle de 500 µm avant (courbe noire, N=10) et après (courbe rouge, N=10) le protocole de réduction d'activité de 20 jours. * P < 0.05: significativement différent de la moyenne Pré du même intervalle de taille.

Ceci se traduit en terme de pourcentage par une répartition des fibres musculaires s'élevant à 27,71% en condition Pré dans l'intervalle [$< 2000 \mu\text{m}^2$; $< 4000 \mu\text{m}^2$] ; tandis qu'en condition « Post » pour ce même intervalle de répartition, la proportion des fibres musculaires s'élève à 51,88%, soit la moitié du nombre des fibres musculaires totales mesurées présentes dans les mêmes mesures.

5.4.3. Évaluation de l'aire de section des fibres exprimant MyHC II

Si on s'intéresse à l'analyse de l'aire de section des fibres musculaires exprimant l'isoforme MyHC IIA, on observe une atrophie significative de -16,3% (pré: $5485 \pm 414 \mu\text{m}^2$, post: $4590 \pm 329 \mu\text{m}^2$; P = 0,047, Figure 70B) pour le groupe "Contrôle". A la différence, aucune diminution significative n'a été observée sur cette même isoforme MyHC IIA concernant le groupe « Cocktail » (pré: $5183 \pm 353 \mu\text{m}^2$, post: $4962 \pm 256 \mu\text{m}^2$; P = 0,30, Figure 70).

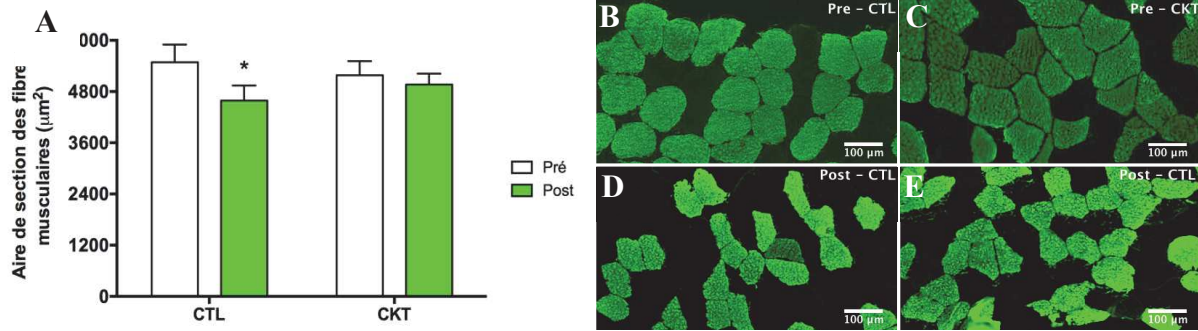


Figure 70 – Aire de section des fibres musculaires de type MyHC IIA du groupe Contrôle (CTL) et Cocktail (CKT)

A : Aire de section des fibres musculaires exprimant MyHC IIA du groupe CTL et CKT avant (Pre) et après (Post) 20 jours de réduction d'activité. *B* : Immunmarquage de coupes musculaires avec l'anticorps anti- MyHCII du groupe CTL et CKT avant et après 21 jours de réduction d'activité. Échelle : 100 μm . *, Post vs. Pre, $p < 0.05$.

5.4.4. Analyse de la distribution des fibres musculaires exprimant MyHC Iia

Le test du Chi-deux, effectué afin de vérifier d'éventuels changements dans la distribution des fibres exprimant MyHC Iia en fonction de leur surface de section, n'a pas révélé de différence de distribution entre les conditions Pre et Post pour le groupe Cocktail. ($\chi^2 = 0.708$; $P = 0,40$; $N=10$, Figure 71). Ce résultat suggère que la contre mesure donnée au groupe Cocktail a permis de limiter l'atrophie engendrée par la réduction d'activité.

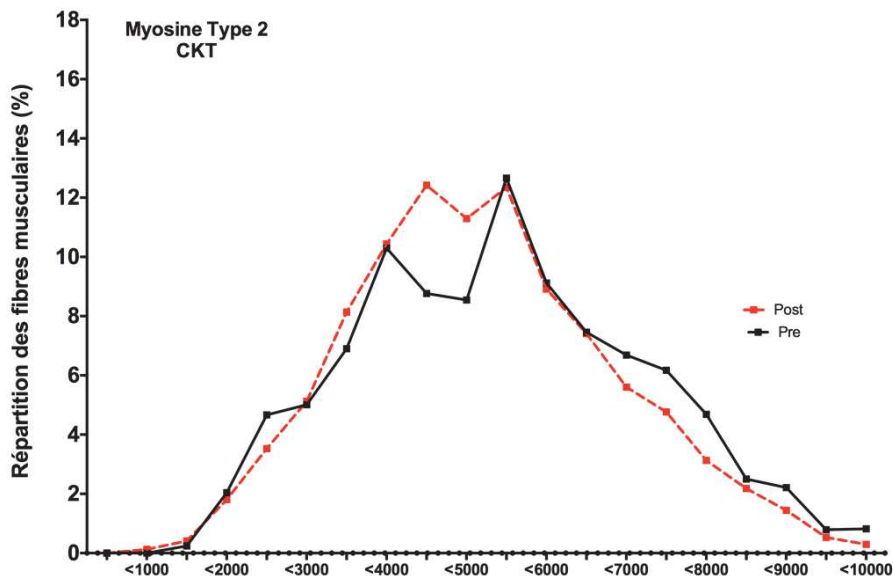


Figure 71 - Répartition des fibres musculaires exprimant MyHC Iia des sujets du groupe "Cocktail"

Répartition les fibres musculaires exprimant MyHC Iia des sujets du groupe « Cocktail » en fonction de leurs tailles réparties par intervalle de 500 μm avant (courbe noire, $N=10$) et après (courbe rouge, $N=10$) le protocole de réduction d'activité de 20 jours.

La représentation de la Figure 72 concerne uniquement la répartition des fibres exprimant MyHC IIA en fonction de l'aire de section pour le groupe « Contrôle ». Le test du Chi-deux met en évidence une augmentation du nombre de fibres exprimant MyHC IIA ayant une surface de section plus petite à l'issue du protocole chez les sujets du groupe « Contrôle » ($\chi^2 = 9.431$; $P = 0.002$; $N=10$). En effet, on observe sur la figure 74 un décalage de la courbe « POST » vers la gauche indiquant une augmentation de la proportion de fibres musculaires exprimant MyHC IIA plus petites.

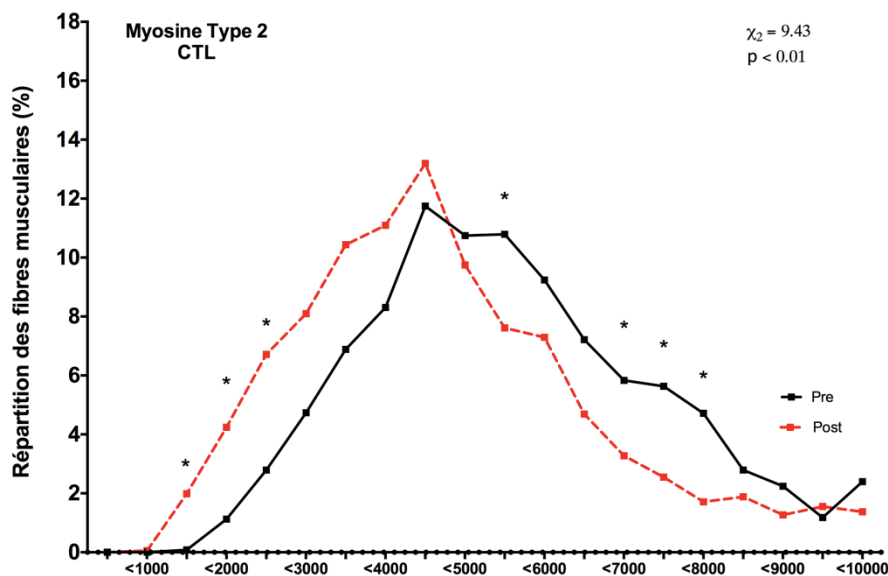


Figure 72 - Répartition des fibres musculaires exprimant MyHC IIA du groupe "Contrôle"

Répartition des fibres musculaires exprimant MyHC IIA des sujets du groupe « Contrôle » en fonction de leur taille, réparties par intervalle de 500 µm avant (courbe noire, $N=10$) et après (courbe rouge, $N=10$) le protocole de réduction d'activité de 20 jours. *, $P < 0.05$; significativement différent de la moyenne Pre.

5.4.5. Changements myotypologiques dus à la réduction d'activité

L'analyse de la proportion fibres musculaires (Figure 73) liée à leur typologie a démontré une diminution significative des fibres musculaires exprimant MyHC I chez les sujets contrôle de $-14,0\% \pm 12,0$ (de $67,89\% \pm 5,1\%$ à $54,36\% \pm 3,5\%$, $P < 0.05$, $N=8$) et de $-26,0\% \pm 5,3\%$ (de $63,8\% \pm 4,4\%$ à $46,9\% \pm 3,7\%$, $P < 0.01$, $N=9$) pour les sujets du groupe Cocktail. Pour les fibres musculaires rapides exprimant MyHC IIA, on observe chez les sujets contrôle une augmentation de la proportion de ce type de fibres de $57,9\% \pm 25,8\%$ (de $32,1\% \pm 5,1\%$ à $44,5\% \pm 3,0\%$, $P=0.055$, $N=8$) et de $54,4\% \pm 17,6\%$ (de $36,2\% \pm 4,4\%$ à $51,4\% \pm 3,7\%$, $P < 0.01$, $N=9$) pour les sujets du groupe Cocktail.

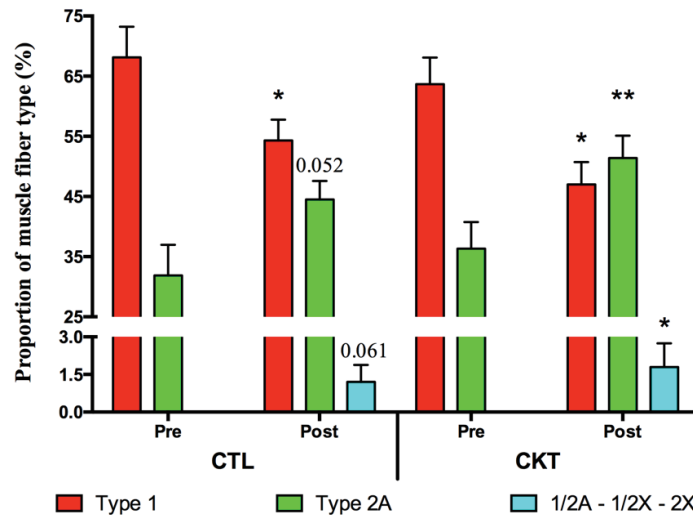


Figure 73 - Évolution de la myotypologie après une réduction d'activité de 20 jours
*Variations (%) de la myotypologie Post vs. Pre des fibres exprimant MyHC I et MyHC IIa et hybrides dans les groupes Contrôle (CTL) et Cocktail (Verduyck et al.), N=8 et N=9 respectivement avant et après 20 jours de réduction d'activité. *, P<0.05 ; **, P<0.01 ; significativement différent Post vs. Pre.*

Par ailleurs, nous observons une modification significative de la myotypologie des fibres musculaires par l'apparition de types de fibres hybrides. Ces fibres coexpriment soient les isoformes de myosine 1 et 2A, soit les isoformes de types 1 et 2X ainsi que les isoformes de types 2X (Figure 74). Aucune fibre hybride n'a été retrouvée en condition PRE, que ce soit chez les sujets Contrôle ou Cocktail. En revanche, on observe une apparition de ces fibres hybrides dans le groupe Contrôle et dans le groupe Cocktail, respectivement avec une proportion de 1,1% ± 0.7% (P=0.061, N=8) et de 1.8% ± 0.9% (P<0.05, N=9).

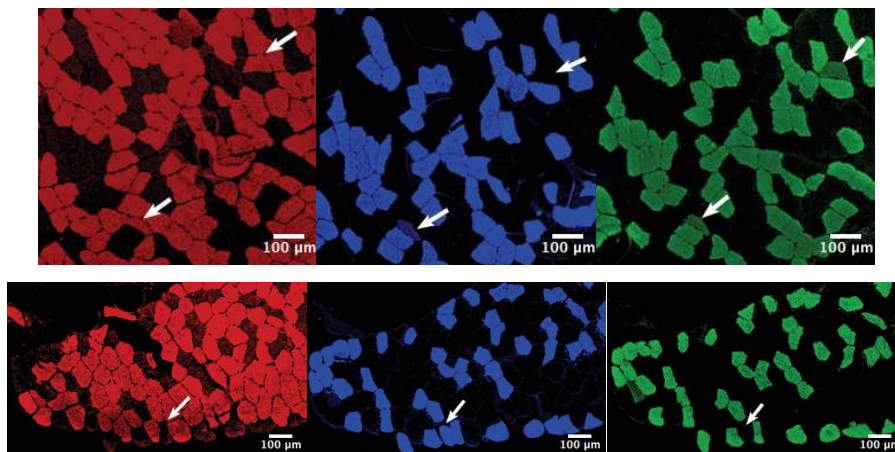


Figure 74 – Illustration des fibres hybrides

Immunomarquage de coupes musculaires à l'aide des anticorps anti-MyHC I et MyHC IIa. Les flèches blanches montrent des fibres co-exprimant les deux isoformes ou exprimant l'isoforme MyHC IIx. Échelle : 100 μm. B : Images immunohistologiques représentant l'apparition de fibres de type 2X. Échelle : 100 μm.

5.5. Caractérisation du déconditionnement musculaire après 60 jours d'alitement prolongé avec et sans contremesure

5.5.1. Atrophie musculaire

L'aire de section des fibres musculaire a été mesurée par analyse morphométrique des coupes cryostat effectuées, immunomarquées avec l'anticorps anti-laminine issus des échantillons de biopsies musculaires du *Vastus Lateralis* 6 jours avant le début de l'alitement (Pré) et au jour 56 de la période d'alitement (Post) (Figure 75). De façon globale, l'analyse morphométrique réalisée sur l'ensemble des sujets démontre une atrophie musculaire globale de 19,2% (de $3612 \mu\text{m}^2 \pm 214 \mu\text{m}^2$ à $2896 \mu\text{m}^2 \pm 152 \mu\text{m}^2$; $N=10$; $p = 0.0588$) entre les conditions Pré et Post (Figure 75)

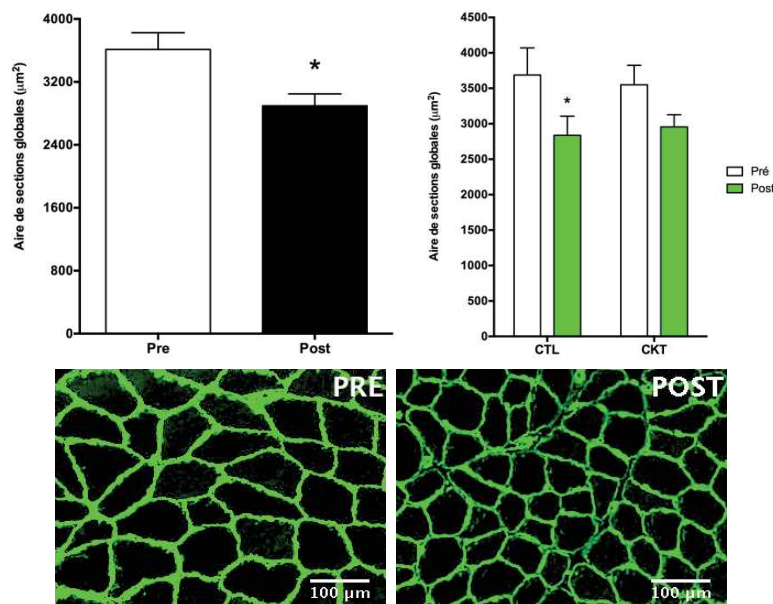


Figure 75 - Évaluation de l'atrophie musculaire globale après 60 jours d'alitement prolongé de 60 jours

A : Aire de section des fibres musculaires après 60 jours d'alitement prolongé (Post-Pre-R+10 ; $N=10$). **B :** moyennes \pm SEM de l'aire de section des fibres musculaires après 60 jours d'alitement prolongé (Post-Pre-R+10 ; $N=10$) selon les groupes contrôle (CTL) et cocktail (Verduyck et al.). **C :** Immunomarquage de coupes musculaires avec l'anticorps anti-Laminine avant (Pré), après (Post) l'alitement. Échelle = 100 μm .

Lorsque l'ensemble des données de surface de section des sujets des deux groupes étaient poolés, le test du Chi-deux a mis en évidence une augmentation du nombre de fibres ayant une surface de section plus petite à l'issue du protocole ($\chi^2 = 10,61$; $P < 0,001$; $N=10$; Pré vs. Post, Figure 76). En effet, on observe une augmentation de la proportion des fibres sur

l'intervalle $<1000 \mu\text{m}^2$ (de $1,83\% \pm 0,26\%$ à $5,73\% \pm 1,49\%$; $p < 0,01$) ; $<1500 \mu\text{m}^2$ (de $2,90\% \pm 0,73\%$ à $9,39\% \pm 2,00\%$; $p < 0,01$) et sur l'intervalle $<2000 \mu\text{m}^2$ (de $6,08\% \pm 1,52\%$ à $10,44\% \pm 1,48\%$; $p < 0,05$).

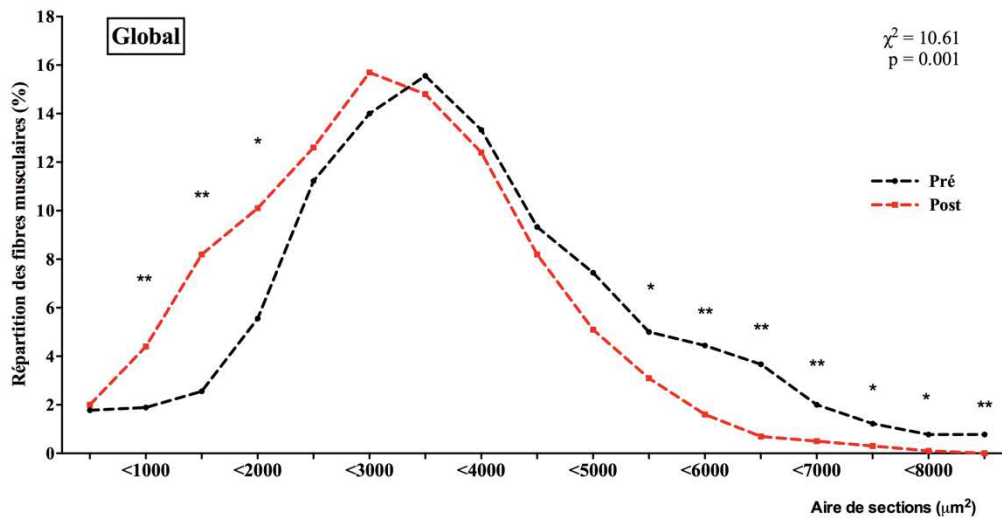


Figure 76 - Évaluation de l'atrophie musculaire globale après 60 jours d'alitement prolongé

Répartition des fibres musculaires en fonction de leur surface de section avant (Pré, noir) et après (Post, rouge) 60 jours d'alitement prolongé

Nous avons également observé une diminution significative de la proportion de grandes fibres dès l'intervalle $<5500 \mu\text{m}^2$ jusqu'à $<8500 \mu\text{m}^2$ ($p < 0,05$; $p < 0,01$; $P < 0,001$; selon les intervalles).

5.5.2. Changements myotypologiques

L'analyse de l'aire de section des fibres musculaires effectuée avec un test-T de Student pour échantillons appariés, ou non ; liée au type de fibre n'a montré aucune modification significative de l'aire de sections des fibres musculaires lentes dites de type I, de type IIA, de type I/IIA et de type IIX (Figure 77; $P < 0,85$).

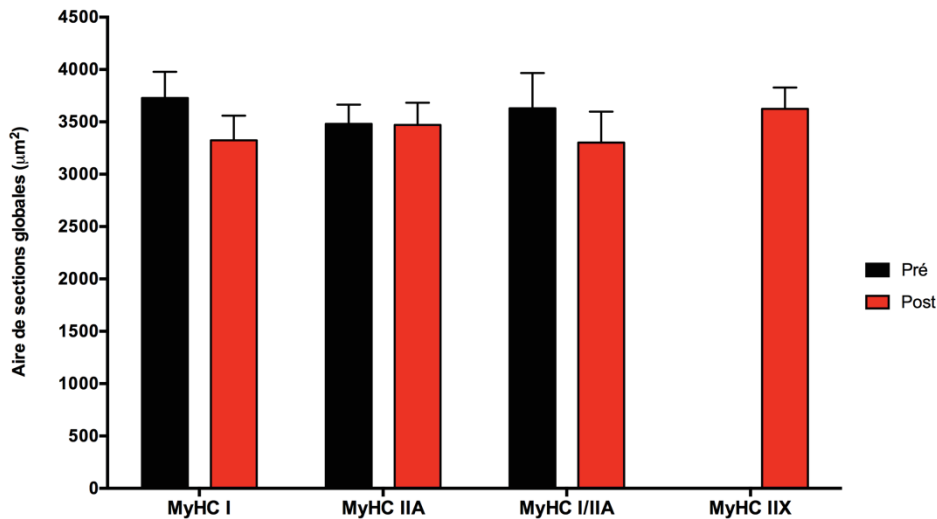


Figure 77 - Évolution de l'aire de sections des différents types de fibres musculaires durant l'alitement prolongé de 60 jours

Aire de section des différents types de fibres musculaires (exprimant MyHC I, MyHC IIA, MyHC I/IIA, MyHC IIX) avant (Pré, noir) et après (Post, rouge) 60 jours d'alitement prolongé.

Nos résultats ont également rapporté un changement significatif dans la myotypologie après 60 jours d'alitement prolongé, se traduisant par une apparition significative de la proportion de fibres de type IIX (Figure 78). En effet aucune fibres IIX n'a été trouvée en condition Pré tandis qu'en condition Post 2,32% ± 1,68% des fibres sont identifiées ($P < 0,001$). On observe également une diminution significative de la proportion de fibres de type I de 11,4% après l'alitement prolongé ($p < 0,05$).

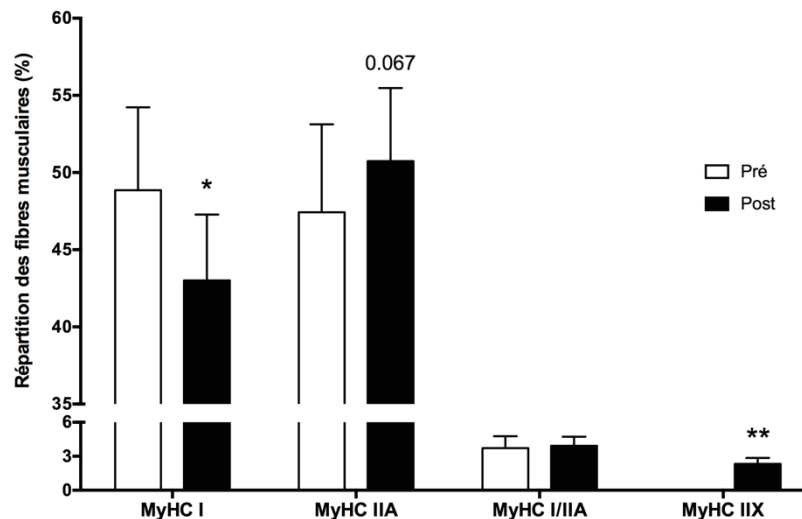


Figure 78 - Évolution de la myotypologie suite à 60 jours d'alitement prolongé

Moyennes ± SEM de la proportion des différents types de fibres musculaires (MyHC I, MyHC IIA, MyHC I/IIA, MyHC IIX) pendant le protocole expérimental (Pré en blanc, Post en gris; N=10).

En observant l'histogramme découpé selon un intervalle en abscisse régulier de la taille globale des fibres de type I, ici 500 μm (Figure 79), nous notons une différence dans la distribution entre les groupes Pré et Post ($\chi^2 = 4,202$; $p = 0,040$; $N=10$). En effet, on observe une augmentation presque significative de la proportion des fibres de type I uniquement sur l'intervalle $<1500 \mu\text{m}^2$ (de $1,41\% \pm 0,62\%$ à $5,81\% \pm 3,38\%$; $p = 0,06$). On observe une diminution significative à l'inverse de la proportion des fibres de type I concernant l'intervalle $<6500 \mu\text{m}^2$ (de $4,38\% \pm 1,43\%$ à $1,38\% \pm 0,59\%$; $p < 0,05$). Aucune différence n'est observée concernant la distribution des fibres de type IIA entre les groupes Pré et Post.

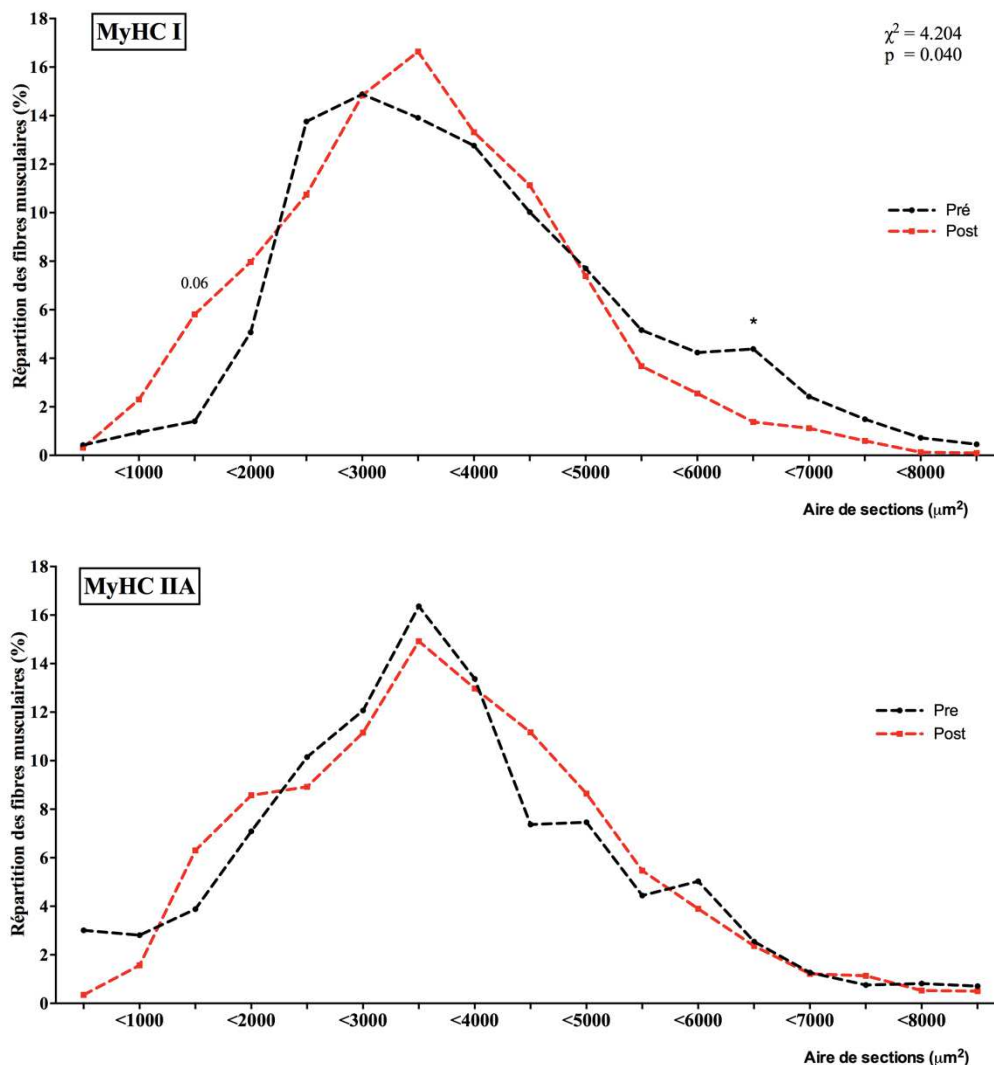


Figure 79 - Analyse de la distribution des fibres musculaire de type I et IIA

Histogramme représentant la répartition les fibres musculaires de type I des sujets avant l'alitement (Pre, trait noir), après l'alitement (Post, trait rouge) ; $N=10$. Histogramme représentant la répartition les fibres musculaires de type IIA des sujets avant l'alitement (Pre, trait noir), après 60 jours d'alitement (Post, trait rouge) ; $N=10$.

5.6. Étude de protéines clés de la balance protéique

5.6.1. Protocole de réduction d'activité

Aucune modification du niveau d'expression des protéines relatives à la balance protéique n'a été observée après le protocole de réduction d'activité de 20 jours (Figure 80).

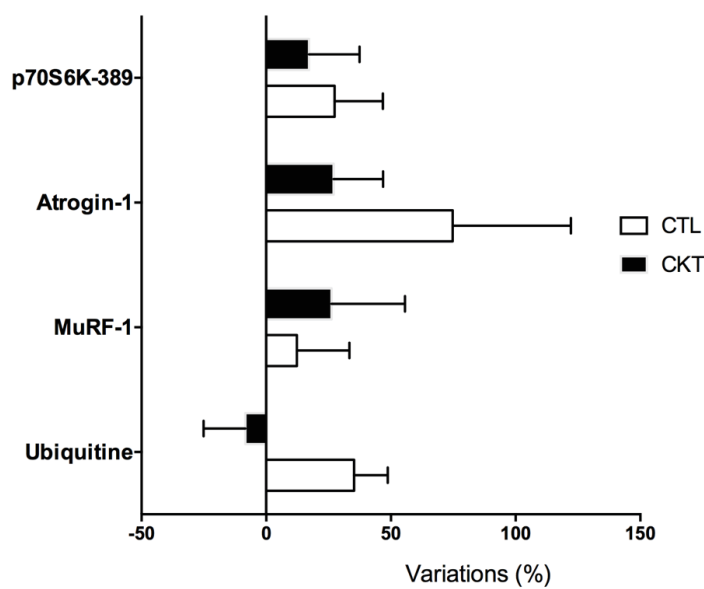


Figure 80 - Analyse de l'expression de la balance protéique

Représentation du pourcentage de variation Post vs. Pré des protéines caractérisant la balance protéique du groupe Contrôle et Cocktail.

5.6.2. Protocole d'alitement prolongé

Aucune modification du niveau d'expression des protéines relatives à la balance protéique n'a été observée après la période d'alitement prolongé de 60 jours (Figure 81).

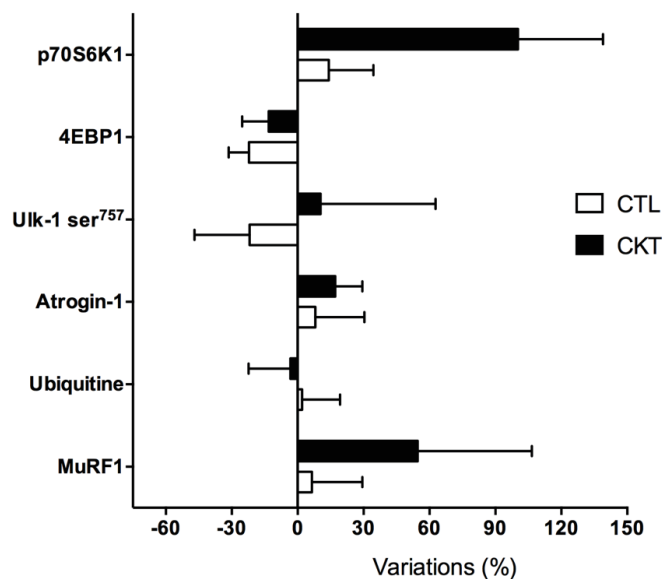


Figure 81 - Analyse de l'expression de la balance protéique

Représentation du pourcentage de variation Post vs. Pré des protéines caractérisant la mitochondriogénèse des groupes Contrôle et Cocktail. N=8, 9 ou 10 selon les protéines quantifiées.

5.7. Analyse de la mitochondriogénèse

5.7.1. Protocole de réduction d'activité

Aucune modification du niveau d'expression des protéines relatives à la mitochondriogénèse n'a été observée après le protocole de réduction d'activité de 20 jours (Figure 82).

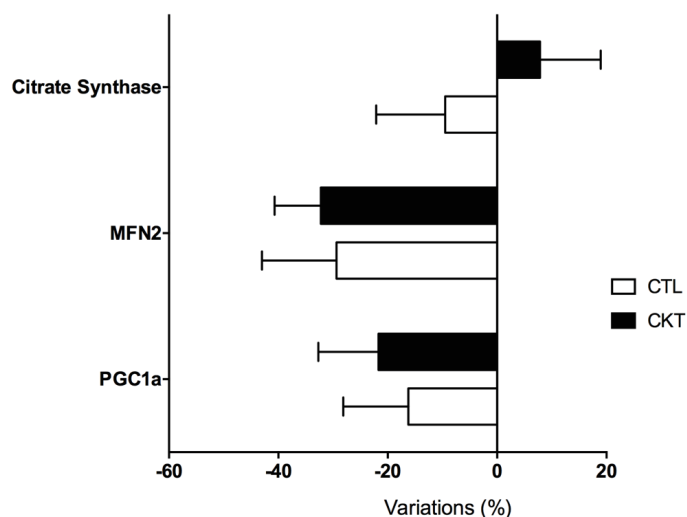


Figure 82 - Analyse de l'expression de la mitochondriogénèse

Représentation du pourcentage de variation Post vs. Pré des protéines caractérisant la mitochondriogénèse du groupe Contrôle et Cocktail.

5.7.2. Protocole d'alitement prolongé

L'analyse des niveaux d'expressions des protéines correspondant la caractérisation de la mitochondriogénèse (Figure 83) indique aucune modification significative de l'expression de Cytochrome C aussi bien dans le groupe Contrôle (+43,7% ± 78,8%, N=5 ; p=0,30) que dans le groupe Cocktail (+126,6% ± 116,6%, N=5 ; p=0,46). On observe néanmoins une tendance significative concernant une diminution d'expression de Citrate Synthase, que ce soit dans le groupe Contrôle (-39,1 ± 17,6, N=5 ; p=0,056) que dans le groupe Cocktail (-22,6 % ± 11,1 %, N=5 ; p=0,06). Aucune modification significative de l'expression de Fission-1 n'est à noter dans le groupe Contrôle (-0,8 % ± 14,7 %, N=5 ; p=0,19) et dans le groupe Cocktail (-7,8 % ± 8,5%, N=5 ; p=0,16). On observe néanmoins une diminution significative concernant l'expression de Cox IV dans le groupe Contrôle de 33,7 % ± 35,9, N=5 ; p=0,042 ; et une tendance concernant une diminution dans le groupe Cocktail (-22,3 % ± 29,3 %, N=5 ; p=0,069). Aucune modification significative de l'expression de MFN2 n'est à noter dans le groupe Contrôle (-33,3 % ± 21,1 %, N=5 ; p=0,09) et dans le groupe Cocktail (+246,2 % ± 229,4%, N=5 ; p=0,25). Aucune modification significative de l'expression de PGC1a n'est à noter dans le groupe Contrôle (+51,7 % ± 31,3 %, N=5 ; p=0,11) et dans le groupe Cocktail (+94,6 % ± 81,4%, N=5 ; p=0,11).

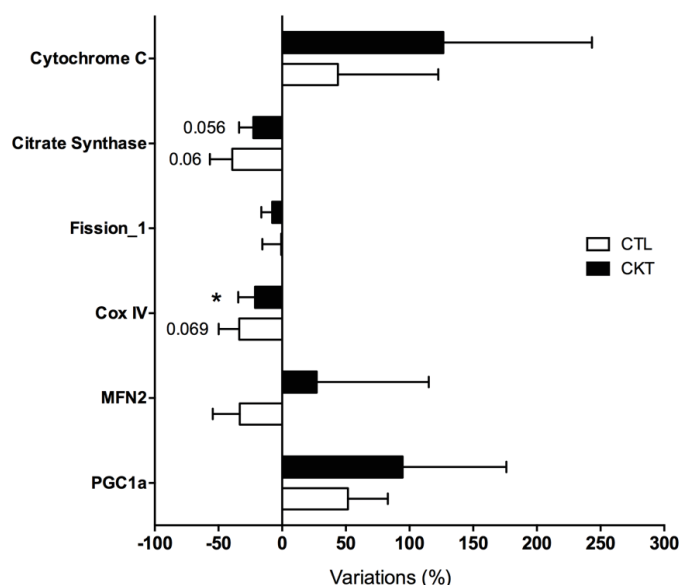


Figure 83 - Analyse de l'expression de la mitochondriogénèse

Représentation du pourcentage de variation Post vs. Pré des protéines caractérisant la mitochondriogénèse des groupes Contrôle et Cocktail. *, $p < 0,05$, **, $p < 0,01$; Post. Vs. Pré ; N=8, 9 ou 10 selon les protéines quantifiées.

6. Conclusion

Bien que les effets de divers polyphénols, des acides gras oméga 3 et des vitamines antioxydantes, étudiés de façon isolée ou en combinaison, ont été décrits dans diverses conditions (Mukai *et al.*, 2010; G. I. Smith *et al.*, 2011; Zwart *et al.*, 2010), ces études sont les premières à tester l'efficacité d'un cocktail de nutriments pour contrer les effets négatifs de l'inactivité physique et de l'inactivité physique avec supplémentation en fructose. Le résultat principal de cette étude est lié aux altérations importantes du métabolisme lipidique après 20 jours de réduction d'activité qui peuvent être largement prévenues à l'aide d'une supplémentation. Les résultats ont montré que le cocktail préserve un profil lipidique sanguin en maintenant l'oxydation lipidique et en empêchant une augmentation de la lipogenèse de novo. Les résultats au niveau musculaire suggèrent un effet protecteur contre le déconditionnement musculaire et une capacité de transport et d'oxydation des lipides améliorée dans les mitochondries.

Plusieurs expérimentations sur l'inactivité physique ont été menées à l'aide du modèle d'alitement prolongé pour étudier les adaptations physiologiques des astronautes (Hargens & Vico, 2016). Ces études menées au cours des 60 dernières années ont démontré que l'alitement prolongé allant de 3 jours et jusqu'à 120 jours entraîne, entre autres, une diminution de la dépense énergétique, de la capacité aérobie, une perte de force et de masse musculaire, ainsi qu'une perte osseuse (Hargens & Vico, 2016). En même temps, une résistance à l'insuline se produit, de même qu'une accumulation accrue de graisse ectopique.

Au cours de l'expérimentation de réduction d'activité, les sujets ont diminué leur activité à moins de 3000 pas par jour. Le poids corporel et la masse corporelle sont restés dans l'ensemble stables au cours de l'étude, mais la masse grasse et le pourcentage de graisse corporelle ont augmenté. L'effet sur le poids corporel n'est pas surprenant. Il est susceptible d'être influencé par 1) l'ajustement compensatoire retardé connu dans l'apport énergétique, 2) la durée de l'expérimentation, bien que toutes les études de réduction d'activité de 7 à 14 jours rapportent un gain de poids (Knudsen *et al.*, 2012) Arciero, Smith, & Calles-Escandon, 1998; Hansen *et al.*, 2011) et 3) la supplémentation en fructose entre 10 à 20 jours, d'autres ayant signalé une augmentation de la masse grasse avec une supplémentation (Knudsen *et al.*, 2012). L'augmentation de la masse grasse est donc conforme à la conception de l'étude. Dans l'ensemble, la masse corporelle maigre a été conservée pendant l'étude, bien qu'il y ait eu une

diminution de la section transversale du muscle squelettique dans le groupe témoin, ce qui suggère que le cocktail étudié pourrait prévenir l'atrophie musculaire.

Il y a eu une diminution des sections transversales (CSA) des fibres de type 1 et 2.. Ceci confirme des résultats antérieurs et associe de manière classique la réduction d'activité à une perte de masse musculaire (Chopard, Hillock, & Jasmin, 2009). Fait intéressant, ces effets ont été limités par le cocktail et peuvent être associés à la diminution de l'ubiquitination et de l'expression de BCL2, facteurs connus pour favoriser l'atrophie. Il a déjà été démontré que le resvératrol limitait l'atrophie chez les rats dans le modèle de suspension du train arrière (Momken *et al.*, 2011) et une étude récente rapporte que les acides gras oméga-3 retardent la dégradation musculaire chez la souris (Soni *et al.*, 2016). Cependant, il n'existe pas actuellement d'études mécanistes sur les effets des cocktails nutritifs, ce qui souligne la nécessité d'études futures pour optimiser la définition des contremesures.

*Publication scientifique de
l'étude*

1 **A nutrient cocktail prevents the deterioration in lipid metabolism induced by 20 days of daily**
2 **steps reduction and fructose overfeeding**

3

4 Anthony Damiot^{1*}, Rémi Demange², John Noone⁴, Isabelle Chery¹, Alexandre Zahariev¹, Sylvie
5 Normand⁶, Thomas Brioché², François Crampes^{11,12}, Isabelle de Glisezinski¹³, Etienne Lefai^{3,6},
6 Marie Pierre Bareille¹⁴, Angèle Chopard², Jocelyne Draï^{6,7}, Delphine Collin-Chavagnac^{6,7}, Martina
7 Heer¹⁰, Guillemette Gauquelin-Koch¹⁵, Michel Prost¹⁶, Patrick Simon¹⁶, Guillaume Py², Stéphane
8 Blanc^{1*}, Chantal Simon^{3,6*}, Audrey Bergouignan^{1,8,9*}, Donal J. O’Gorman^{4,5*}

9

10 * These authors contributed equally to the work.

11

12 **Authors’ current affiliations :**

13 ¹ Université de Strasbourg, CNRS, IPHC UMR 7178, F-67000 Strasbourg, France

14

15 ² Université de Montpellier, INRA, UMR866 34060, Dynamique Musculaire et Métabolisme, F-
16 34060, Montpellier, France

17 ³ CARMEN, INSERM U1060/University of Lyon 1/INRA U1235 Lyon, France.

18 ⁴ National Institute for Cellular Biotechnology & School of Health and Human Performance, Dublin
19 City University, Ireland

20 ⁵ 3U Diabetes Consortium, Dublin City University, Ireland.

21 ⁶ Centre for Research in Human Nutrition (CRNH) Rhône-Alpes, Lyon 1 University, CarMeN,
22 INSERM U1060, INRA U1235, Lyon, France

23 ⁷ Laboratoire de Biochimie CHLS 69310 Pierre Bénite, France

24 ⁸ Anschutz Health and Wellness Center, Anschutz Medical Campus, Aurora, Colorado, USA.

25 ⁹ Division of Endocrinology, Metabolism and Diabetes, University of Colorado, Anschutz Medical
26 Campus, Aurora, Colorado, USA.

27 ¹⁰ Institute of Nutritional and Food Sciences, University of Bonn, Bonn, Germany

28 ¹¹ INSERM, UMR 1048, Obesity Research Laboratory, Institute of Metabolic and Cardiovascular
29 Diseases, Toulouse, France

30 ¹² Paul Sabatier University, Toulouse, France

31 ¹³ INSERM, UMR1048, Obesity Research Laboratory, Institute of Metabolic and Cardiovascular
32 Diseases and University of Toulouse, Paul Sabatier University and Toulouse University Hospitals,
33 Departments of Clinical Biochemistry and Sports Medicine, Toulouse, France

34 ¹⁴ MEDES, Institut de Médecine et de Physiologie Spatiales, 31400, Toulouse, France

35 ¹⁵ CNES, 75001 Paris, France

36 ¹⁶ Laboratoire de recherches appliquées Spiral/Kirial International, 21560 Couternon, France

37 ¹⁷ Hôpital St-Joseph St-Luc, 69007 Lyon, France

38

39 **Running title:** Nutrient cocktail protects against physical inactivity

40

41 **Key words:** nutrition, sedentary behaviours, countermeasure, polyphenols, omega-3 fatty acids,
42 vitamins

43

44

45

46 **Corresponding author:**

47 Stéphane Blanc

48 IPHC-DEPE

49 Centre National de la Recherche scientifique,

50 23 rue Becquerel

51 67087 Strasbourg, France.

52 Tel : 0609121847

53 E-mail : stephane.blanc@iphc.cnrs.fr

54

55 **Reprint requests:**

56 Stéphane Blanc

57 IPHC-DEPE

58 Centre National de la Recherche scientifique, 23 rue Becquerel

59 67087 Strasbourg, France.

60 Tel : 0609121847

61 E-mail : stephane.blanc@iphc.cnrs.fr

62

63 **Sources of support:** The present study was supported by grants from the CNRS and from the

64 European (ESA) and French (CNES) Space Agencies. AD and RD are supported by PhD

65 fellowships from CNES.

66

67 **Disclosure summary**

68 The authors report no conflict of interests.

69

70

71

72

73

74 **ABSTRACT**

75

76 **Context:** Physical inactivity and sedentary behaviours are recognized as major independent risks
77 factors for numerous diseases.

78 **Objective:** We examined the capacity of a nutrient cocktail composed of polyphenols, omega-3
79 fatty acids, vitamin E and selenium to prevent the metabolic deteriorations induced by 20 days of
80 step reduction, along with fructose overfeeding during the last 10 days.

81 **Design/Setting/Participants:** Twenty healthy trained men (14,000 steps per day and engaged in
82 sports) were randomly divided into a control group (no supplementation) and a cocktail group for a
83 20-day free-living intervention during which they decreased their daily steps to 3000. On days 0, 10
84 and 20 we measured body composition (DXA), blood chemistry, glucose tolerance (OGTT) and
85 substrate oxidation (indirect calorimetry). Glucose tolerance included 1% fructose labelled with (U-
86 ¹³C) fructose to assess liver *de novo* lipogenesis. Histological changes and related cellular markers
87 were assessed from muscle biopsies collected on days 0 and 20.

88 **Results:** While the cocktail did not prevent the deterioration of insulin sensitivity and its muscular
89 correlates induced by the intervention, it fully prevented the hypertriglyceridemia, the drop in
90 fasting HDL and total fat oxidation as well as the increase in *de novo* lipogenesis. The cocktail
91 further prevented the decrease in muscle cross-sectional area and was associated with lower protein
92 ubiquitination content. The circulating anti-oxidant capacity was improved by the cocktail
93 following the OGTT, but not in fasting state.

94 **Conclusion:** A cocktail of nutrient compounds from dietary origin protect against the deterioration
95 in lipid metabolism induced by physical inactivity and fructose overfeeding.

96

97 **PRECIS**

98 The deleterious effects on lipid metabolism in healthy trained men adopting a sedentary lifestyle for
99 20 days can be prevented by a daily nutrient cocktail containing various polyphenols, omega-3 fatty
100 acids and anti-oxidant vitamins and oligo element selenium.

101

102 **INTRODUCTION**

103

104 Physical inactivity has emerged as an important risk factor for a number of chronic metabolic and
105 cardiovascular diseases, and sedentary behaviors are associated with adverse health effects even in
106 subjects who meet the levels of current recommendations on physical exercise (1). This *sedentary*
107 *death syndrome* (2) triggered numerous research studies on disease aetiology and prompted the
108 need for preventive strategies.

109

110 Some of the most detailed investigations of physical inactivity were conducted using the bed-rest
111 analogue to investigate the physiological adaptations of astronauts (3). These studies conducted
112 over the past 60 years, have demonstrated that bed-rest ranging from as little as 3 days and up to
113 120 days leads to, amongst others, decrease in energy expenditure, aerobic capacity, and muscle
114 mass and strength, and loss of bone tissue (3). Concomitantly, a decrease in insulin sensitivity
115 occurs along with metabolic inflexibility and ectopic fat accumulation (4,5).

116

117 Numerous countermeasures focused on exercise training were tested to prevent these changes but,
118 so far, none have proved to be fully effective (6). More recently, nutrition and micronutrient
119 supplements, omega-3 fatty acids, vitamins and other bioactive compounds from the diet appeared
120 to reduce several of the deconditioning effects observed in space or analogs. Both astronauts and
121 bed-resting subjects consuming diets supplemented or rich in omega-3 fatty acids displayed lower
122 loss in bone density in response to disuse (7), and supplemented elderly subjects showed
123 improvements in protein synthesis and insulin sensitivity (8). In rodents, hind-limb suspension
124 studies reported that supplementation with vitamin E modifies metabolic gene expression, reduces
125 systemic inflammation and increases mitochondrial biogenesis and insulin sensitivity (9). Although
126 these results showed convincing effects, it is unlikely that any single micronutrient will be
127 sufficiently powerful to reverse the deleterious effects of physical inactivity. Recently the notion of

128 nutrient cocktails, to trigger additive and/or synergistic effects, has been tested by combining
129 complementary bioactive compounds, proving to be efficient in several metabolic conditions (10).

130

131 While these micronutrients have the potential to reduce the risk of metabolic disease there are no
132 studies in the literature examining their impact on physical inactivity-induced metabolic alterations.

133 The purpose of this study was to determine the preventive effect of a nutrient cocktail composed of
134 polyphenols, omega-3 fatty acids, vitamin E and selenium on the metabolic and physiological
135 changes that occur during 20 days of reduced daily steps in trained men. To further trigger
136 metabolic deterioration, dietary fructose supplementation was provided during the last 10 days of
137 the trial. We hypothesized that the cocktail supplementation would reduce and/or prevent the
138 deterioration in glucose and lipid metabolism, insulin sensitivity and muscle atrophy that is
139 associated with reduced physical activity and fructose overfeeding.

140

141

142

METHODS

143 **Subjects**

144 Twenty healthy trained young men were recruited. Characteristics are presented in Table 1.
145 Physical activity was assessed using hip-worn triaxial accelerometry (Actigraph GT3x+™,
146 Actigraph USA) for 7 days. Subjects were included if they walk >10,000 steps/day, participated in
147 at least two leisure sport sessions per week and were free of any known diseases. Subjects were
148 excluded if not able to drastically reduce professional, leisure and transport-related physical
149 activities. This study was approved by the local ethical committee and all subjects provided written
150 informed consent (ID-RCB number: 2015-A00665-14).

151

152 **Experimental design**

153 The experiment outflow is presented in Figure 1. Participants were randomly assigned to control
154 (n=10) or daily nutrient cocktail supplemented (n=10) groups. The nutrient cocktail XXS2A was
155 designed by Spiral Company as a pill taken at each meal for a total of 560.7mg/d of polyphenols
156 (127.1mg/d flavonols, 47.7mg/d phenylpropanoids, 79.4mg/d oligostylbenes, 49.1mg/d
157 hydroxycinnamic acids, 143mg/d flavanols and 114.4mg/g flavonons), 168mg/d vitamin E +
158 80µg/d selenium (Solgar) and 2.1g/d omega-3 fatty acids (Omacor). During the 20-day study in
159 free-living conditions, volunteers were asked to stop exercising and drastically reduce their daily
160 physical activity. Subjects were instructed to walk a maximum 2,500-4,000 steps/day. This was
161 controlled on a daily basis by the subject and the investigators through a wrist-worn Fitbit
162 pedometer (Fitbit USA). Accurate data were assessed using an Actigraph GT3x+™ hip-worn
163 throughout the experiment. Metabolic stress induced by physical inactivity was boosted during the
164 last ten days of the protocol by ingesting 3g/kg/d of fructose (Vivis® fructose) mixed with
165 0.5g/kg/d glucose in water to alleviate intestinal problems (11,12), on top of their regular diet.
166 Fasting blood collection, glucose tolerance, substrate oxidation and *de novo* lipogenesis were
167 undertaken at baseline and after 10 and 20 days of reduced activity. Muscle biopsies and body
168 composition measurement were completed at baseline and after 20 days (Figure 1). Diet was not
169 controlled during the intervention and subjects were instructed to eat according to their appetite.

170

171 **Body composition**

172 Fat-mass (FM) and lean-body-mass (LBM) was assessed using a dual-energy X-ray absorptiometer
173 (DXA, HOLOGIC QDR 4500W, USA).

174

175 **Glucose tolerance and substrate use**

176 Subjects reported to the clinic the evening prior to the test. A standard dinner was given containing
177 47.7% carbohydrates, 32.5% lipids and 17.8% protein. An oral glucose tolerance test (OGTT) was
178 performed after an overnight fast using a mix of 1g/kg of glucose and 0.5g/kg of fructose diluted in

179 300mL of water; 1% of fructose was labelled with U-¹³C-fructose (Eurisotop, Paris). Following
180 baseline collection and glucose/fructose ingestion, blood samples were collected every 15-min for
181 the first 3 hours and every 30-min for the 4th hour. Carbohydrate and fat oxidation rates were
182 determined every hour using canopy dilution respirometry (Quark, Cosmed, Italy) and the classical
183 equation of indirect calorimetry corrected for urinary nitrogen excretion. Insulin sensitivity was
184 estimated using the Matsuda Index (13). Metabolic flexibility, defined as the ability to adjust
185 nutrient oxidation to nutrient availability and demand, was assessed during the OGTT by examining
186 the relationship between the variance of plasma insulin and non-protein respiratory quotient
187 (NPRQ). As explained previously (4) the variance-derived indexes assume a metabolically flexible
188 state when the variance in insulin is low and the variance in NPRQ is high; in other words, when the
189 body has a high capacity to switch from fat to carbohydrate oxidation in association with small
190 changes in insulin concentration in response to OGTT. A transition towards a metabolically
191 inflexible state is assumed when the variance in insulin increases and/or the variance in NPRQ
192 decreases.

193

194 **Exogenous fructose oxidation**

195 Exhaled breath samples were collected at the same time as blood samples. Breath ¹³C/¹²C isotopic
196 ratio was measured in triplicate on a GasBench system (Thermo Scientific, Germany) connected to
197 a continuous-flow isotope ratio mass spectrometer (DELTA V, Thermo Scientific, Germany). U-
198 ¹³C-fructose oxidation was calculated as the cumulated percentage dose recovery of ¹³C in expired
199 CO₂ per hour over the OGTT, as previously described (14).

200

201 **Liver *de novo* lipogenesis**

202 *De novo* lipogenesis was measured as the apparition of 1-¹³C-palmitate from U-¹³C-fructose in very
203 low density lipoprotein (VLDL). In brief, as previously described (14) VLDL were separated by
204 sequential ultracentrifugation and total lipids were extracted from VLDL by a modified Folch

205 technique. TGs were further separated by solid phase extraction and derivatized into methyl esters.
206 The absolute concentration of both unlabelled and labelled palmitate was measured by gas
207 chromatography/mass spectrometry (Agilent 5975, Inert XL) through a dual acquisition program in
208 single ion monitoring m/z ratios of 270 and 271, and calculated by reference to internal standards
209 added to the plasma. The concentration of 1-¹³C-palmitate was calculated by multiplying its molar
210 percent enrichment (MPE) by the concentration of total palmitate.

211

212 **Blood sample analyses**

213 Plasma insulin was assessed by radio-immuno assay, and glucose, NEFA and TG were measured by
214 colorimetric assays and enzymatic methods, as previously described (14). Reduced and oxidized
215 glutathione (GSH and GSSG, respectively) concentrations were simultaneously measured by
216 reverse-phase high performance liquid chromatography (HPLC) as previously described (15). Total
217 plasma malondialdehyde (MDA) was determined by reverse-phase HPLC (16). The antioxidant
218 defenses were examined using a test based on *in vitro* free-radical-induced blood hemolysis KRL
219 test (Kirial International/Spiral, Couternon, France)(17).

220

221 **Muscle biopsies and parameters**

222 Muscle biopsies were performed on the mid *Vastus Lateralis* (VL) under aseptic conditions and
223 after anaesthesia (2% w/v lidocaine HCl) using Bergström skeletal muscle biopsy needle (Lauran
224 Médical®, KBM 5/10). One piece was mounted in tragacanthum gum (OCT Compund) for
225 histological analysis, cooled to the temperature of liquid nitrogen in isopentane, and the remainder
226 was snap frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until further analysis. **Muscle fiber typing:**
227 The proportion of type I, IIa and IIb fibers and fiber cross-sectional areas (CSA) were determined
228 on transverse serial cross sections of VL samples using immunofluorescent antibodies. **Protein**
229 **expression:** Western blotting was performed according to established protocols. Briefly,
230 membranes were blocked and probed with primary and secondary antibodies and detected by

231 chemiluminescence. Proteins were normalised to GAPDH or Coomassie stained gels. *Citrate*
232 *Synthase Activity*: Citrate synthase activity of muscle samples was measured using a commercially
233 available kit, as reported before (18). Further details can be found in supplemental material.

234

235 **Data and statistical analysis**

236 The effects of the intervention and the cocktail supplementation on the outcomes were assessed by
237 using mixed linear models with group, intervention, group-by-intervention interaction and baseline
238 values as fixed effects and subjects as random effect. Additional adjustment for FM and LBM was
239 performed for substrate oxidation. Between-group differences were assessed by using post-hoc tests
240 at each time point. Data obtained during OGTT are presented as area under the curve (AUC).
241 Significance was set up at 0.05 for main effects and 0.10 for interaction effects. Values are mean \pm
242 SEM. Statistical analysis were performed with SAS version 9.4 (SAS Institute, Cary, USA).

243

244 **RESULTS**

245

246 **Physical characteristics**

247 Participants' compliance was very good; over the 20-day intervention daily steps went down from
248 14,000 to 3,000 on average in both groups. Although the intervention did not modify body and lean
249 mass, we observed a significant increase in FM, of less than 1kg, independent of the cocktail
250 supplementation.

251

252 **Glucose tolerance and insulin sensitivity**

253 Fasting plasma glucose and insulin were neither affected by the intervention nor by the cocktail
254 supplementation (Table 2). During the OGTT, glucose concentration did not change; insulin
255 increased after 10 days of reduction in daily steps (Figure 2) but did not further change after 10
256 more days of inactivity combined with fructose overfeeding. Reduction in daily steps reduced

257 insulin sensitivity in both groups as indicated by the decrease in Matsuda index. Fasting high
258 molecular weight (HMW) adiponectin increased during the intervention in both groups, but the
259 increase was greater in the supplemented group compared to the control group after 20 days of
260 intervention (Table 2). Total carbohydrate oxidation and exogenous fructose oxidation during the
261 OGTT increased similarly in both groups after both 10 and 20 days of intervention (Figure 2).
262 While a group-by-intervention interaction almost reached significance for an increase in insulin
263 variance, significant decrease in NPRQ variance was observed during the OGTT in the control
264 group after both 10 and 20 days of intervention, that was fully prevented by the supplementation
265 (Figure 2). This indicates a development of metabolic inflexibility in the control group but not in
266 the supplemented group, that was likely due to decreased oxidative capacities in association with
267 metabolic adaptations at muscle level. Of note, most metabolic changes were observed after 10 days
268 of inactivity only; the addition of 10 more days of reduced daily steps combined with fructose
269 overfeeding did not lead to further modifications.

270

271 **Lipid metabolism**

272 Fasting TG and HDL respectively increased and decreased in the control group after both 10 and 20
273 days of intervention (Table 2). Similar responses were observed during the OGTT (Figure 3). TG,
274 VLDL-TG, palmitate VLDL-TG and *de novo* lipogenesis from fructose gradually and significantly
275 increased after 10 and 20 days of intervention in the control group. The intervention decreased total
276 lipid oxidation in association with an increase in net lipid synthesis (Figure 3), as indicated by the
277 negative values of lipid oxidation, thus confirming the increase in *de novo* lipogenesis as measured
278 by stable isotopes. The cocktail supplementation fully prevented the increase in lipemia in both
279 fasting state and during the OGTT, the decrease in total lipid oxidation and the increase in *de novo*
280 lipogenesis measured both by tracer technique and indirect calorimetry induced by the daily step
281 reduction with or without fructose overfeeding.

282

283 **Anti-oxidant capacity**

284 Fasting oxidative markers remained unaffected by either the intervention or the supplementation
285 (Table 2). However, blood anti-oxidant capacity following the OGTT decreased in the control
286 group when the fructose overfeeding was added to the daily step reduction while the supplemented
287 group remained at significantly higher values of whole blood anti-oxidant capacity (Figure 3).

288

289 **Skeletal muscle analysis**

290 Muscle parameters are presented in Table 3. While type I fibers CSA was lower in both groups at
291 the end of the intervention, the decrease in type IIa CSA observed in the control group, was
292 prevented by the cocktail supplementation. In line with this observation, ubiquitination content, a
293 protein marker of proteolysis processes, increased only in the control group. At the mitochondrial
294 level both Mitofusin-2 and PGC1 α contents dropped in response to the intervention and we failed to
295 see a protective effect of the cocktail. FATP1, involved in fatty acid transportation at the
296 mitochondrial level, tended to rise in the cocktail group only ($p=0.07$), supporting the maintenance
297 of lipid oxidation during the intervention in the supplemented but not control group. No changes in
298 citrate synthase activity, skeletal muscle intracellular signaling protein contents and oxidative stress
299 markers were observed.

300

301 **DISCUSSION**

302

303 The main findings of this randomized interventional study in lean healthy trained young male are
304 that (i) reduction in daily steps lead to decreased insulin sensitivity and total fat oxidation, resulting
305 in hyperlipemia and increased de novo lipogenesis; and (ii) a cocktail supplement prevents the
306 alterations on lipid metabolism but not insulin sensitivity. This is the first study to test the efficacy
307 of a nutrient cocktail to counteract the negative effects of physical inactivity along with or without
308 fructose overfeeding.

309

310 During the intervention, subjects decreased their activity to <3,000 steps per day. Body weight and
311 lean body mass remained stable during the study but fat mass and the percentage of body fat
312 increased. The effect on body weight is not surprising. It is likely to be influenced by 1) the known
313 delayed compensatory adjustment in energy intake, 2) the duration of the intervention, given some
314 (19,20), but not all studies (21,22) with 7-14 days decreased activity reported weight gain, and 3)
315 the fructose overfeeding between 10-20 days, as others have also reported an increase in fat mass
316 with overfeeding (20). The increase in fat mass is thus in line with the design of the study. Overall,
317 lean body mass was preserved during the study though there was a decrease in skeletal muscle
318 cross-sectional area in the control group, suggesting that the cocktail supplement may delay disuse
319 muscle atrophy.

320

321 There was a progressive decrease in insulin sensitivity during the 20-day intervention, in agreement
322 with other studies when activity was reduced for 3-14 days (19-21,23-25). This was mainly due to
323 increased insulin AUC during the OGTT while we did not show a change in glucose, in agreement
324 with some (2,9) but not all studies (21,24). The additional fructose provided after day 10 did not
325 affect insulin sensitivity but there was a significant increase in carbohydrate oxidation and
326 exogenous fructose oxidation. Knudsen et al (20) reported similar glucose and insulin responses to
327 an OGTT following 14-days of reduced activity and a 50% increase in energy intake. While the
328 Matsuda index, in that study, was significantly lower at day 7 but not day 14, clamp-derived insulin
329 sensitivity had decreased by ~44%. In agreement with other studies of decreased activity (20) or
330 bed-rest (26), we reported an increase in fasting plasma adiponectin after 20 days of decreased
331 activity. This is in contrast with studies where decreased adiponectin is associated with insulin
332 resistance. It is possible that, in these healthy individuals, an increase in adiponectin may be a short
333 term compensatory mechanism to preserve insulin sensitivity. In support of this we did not find a
334 change in Akt and GSK3 following the intervention, but this would need to be further investigated.

335 The nutrient cocktail supplement did not have an effect on carbohydrate metabolism but given the
336 preservation of metabolic flexibility, the effects appear to be more pronounced on lipid metabolism.
337

338 By using bed-rest ranging from 7 to 90 days in men and women we have shown that a hallmark of
339 physical inactivity physiology is a decrease in exogenous lipid clearance due to both a reduced
340 uptake and oxidative capacity at the muscle level (see (4) for review). We further showed in the
341 general population through training/detraining studies that activity energy expenditure is a major
342 determinant of lipid trafficking (plasma pools, chylomicrons, VLDL) and partitioning through
343 uptake (LPL, FAT/CD36, FABPpm) between oxidation (LCCoA synthase, CPT1) and storage
344 (mtGPAT) within the skeletal muscle (27). In the present study, we observed that physical inactivity
345 by voluntary step reduction and physical inactivity plus fructose overfeeding gradually deteriorated
346 fat oxidation to an extent where only net lipid synthesis was observed during the OGTT; similar to
347 our observation during an OGTT following 7-days bed-rest in men and women (28). One of the
348 striking results of the present study is the capacity of the cocktail to fully prevent the effects on lipid
349 oxidation, thus likely preventing the hypertriglyceridemia of the control group. Although no similar
350 data exist, numerous recent studies investigating the impact of various bio-active compounds from
351 the diet, taken as cocktails, in various physio-pathological states and models support our results (29-
352 32). However, mechanistic evidence primarily comes from rodent models. Vitamin E plus omega-3
353 fatty acids supplementation was hepato-protective in naturally aging rats, with major anti-oxidant
354 properties, especially in the brain (33). It was argued that vitamin E reduces the peroxidation of
355 omega-3 fatty acids thus allowing synergistic effects. In support of that, fish oils associated with
356 grape polyphenols in rats fed a high sucrose diet improved numerous blood biochemical parameters
357 such as HDL and TG, as in our study, by significantly enhancing fatty acid beta oxidation (34).
358 Interestingly, the same study showed a major suppression of lipogenic enzymes by their cocktail, in
359 agreement with our human data. A recent review (35) reported evidence that polyphenols play key

360 controlling roles in suppressing *de novo* lipogenesis in various models of non-alcoholic fatty liver
361 diseases.

362

363 In overweight/obese subjects supplemented with omega-3 fatty acids and polyphenols there is a
364 substantial improvement in fasting plasma HDL and their sub-classes (30) as well as post-prandial
365 TG and triglyceride-rich lipoproteins (31). Annuzzi et al. (31) showed reduced oxidative damage
366 through a reduced excretion of 8-isoprostane and this data support the improved global anti-oxidant
367 capacity we observed during the OGTT. Of note, the impact of our cocktail on various markers of
368 anti-oxidant capacity or oxidative markers was quite modest. One may thus argue that, in our study,
369 the principal effects were due to the omega-3 fats, known to boost the whole muscle machinery of
370 lipid metabolism (36), and to a lesser extent to the polyphenols. However, a recent study of 12-
371 week supplementation with epigallocatechin-3-gallate and resveratrol showed major impact on
372 mitochondrial capacity and fat oxidation in 38 overweight and obese men and women (29). In
373 agreement with our data, they did not observe an improvement in insulin sensitivity. In addition,
374 Annuzzi et al. (31) found that the polyphenols reduced circulating TG and VLDL while omega-3
375 reduced postprandial cholesterol and VLDL apolipoprotein B-48. These data support the positive
376 effect on lipid metabolism associated with the cocktail supplement in our study.

377

378 While there is strong evidence which support our results on lipid metabolism following polyphenols
379 and omega-3 supplementation, we also observed interesting effects on the muscle phenotype itself.
380 Indeed, the muscle is known to be plastic in response to mechanical loading and unloading and it
381 was expected that reduction in physical activity, by ~10000 steps/d, would have a detraining and
382 deconditioning effect in healthy trained subjects. There was a global decrease in muscle fiber cross-
383 sectional area with significant reductions in type 1 and type 2 fiber types. Such plasticity in
384 response to exercise or chronic hypoactivity is well known (37). Interestingly, these adverse effects
385 were prevented by the cocktail and may be associated with the decrease in ubiquitination content,

386 factors known to be associated to muscle deconditioning and fiber atrophy. We have previously
387 shown that resveratrol prevented disuse muscle atrophy of hind-limb suspended rats (9), and a
388 recent study reported that omega-3 fatty acids delays muscle degradation in mice (38). However,
389 there are no mechanistic studies examining the effects of nutrient cocktails and further experiments
390 are required.

391

392 Limitations must be acknowledged. The control group did not take a placebo supplement due to
393 difficulties to find a neutral oil to encapsulate. This being said the magnitude of the effects we
394 observed suggest this would have a minor impact on the conclusion of the study. The molecular
395 parameters we selected did not allow us to fully unravel the mechanisms at play and further
396 mechanistic studies are required. Finally, we acknowledge that subjects taking >14,000 step/d do
397 not represent the general population and the results may not be generalizable. Therefore, further
398 studies are needed on less active populations and in at-risk populations for developing metabolic
399 diseases.

400

401 In conclusion, we have demonstrated that the negative effects of physical inactivity on lipid
402 metabolism can be mitigated by micronutrient supplementation. We have established that the early
403 decrements in lipid oxidation contribute to increased *de novo* lipogenesis but that a nutrient cocktail
404 containing polyphenols, omega-3 fatty acids and other compounds can effectively prevent these
405 changes during 20-days of decreased physical activity. These data highlight the importance of
406 regular physical activity to maintain carbohydrate and lipid metabolism. It is possible that this
407 supplement could be an effective prevention strategy for chronic diseases such as cardiovascular
408 disease and type 2 diabetes but long term studies, especially in high risk groups, are now required.

409

410

411 **REFERENCES**

- 412 **1.** Mazzucco S, Agostini F, Biolo G. Inactivity-mediated insulin resistance is associated with
413 upregulated pro-inflammatory fatty acids in human cell membranes. *Clin Nutr* 2010;
414 29:386-390
- 415 **2.** Lees SJ, Booth FW. Sedentary death syndrome. *Can J Appl Physiol* 2004; 29:447-460;
416 discussion 444-446
- 417 **3.** Hargens AR, Vico L. Long-duration bed rest as an analog to microgravity. *J Appl Physiol*
418 (1985) 2016; 120:891-903
- 419 **4.** Bergouignan A, Rudwill F, Simon C, Blanc S. Physical inactivity as the culprit of metabolic
420 inflexibility: evidence from bed-rest studies. *J Appl Physiol* (1985) 2011; 111:1201-1210
- 421 **5.** Kenny HC, Rudwill F, Breen L, Salanova M, Blottner D, Heise T, Heer M, Blanc S,
422 O'Gorman DJ. Bed rest and resistive vibration exercise unveil novel links between skeletal
423 muscle mitochondrial function and insulin resistance. *Diabetologia* 2017;
- 424 **6.** Ploutz-Snyder L. Evaluating countermeasures in spaceflight analogs. *J Appl Physiol* (1985)
425 2016; 120:915-921
- 426 **7.** Zwart SR, Pierson D, Mehta S, Gonda S, Smith SM. Capacity of omega-3 fatty acids or
427 eicosapentaenoic acid to counteract weightlessness-induced bone loss by inhibiting NF-
428 kappaB activation: from cells to bed rest to astronauts. *J Bone Miner Res* 2010; 25:1049-
429 1057
- 430 **8.** Smith GI, Atherton P, Reeds DN, Mohammed BS, Rankin D, Rennie MJ, Mittendorfer B.
431 Dietary omega-3 fatty acid supplementation increases the rate of muscle protein synthesis in
432 older adults: a randomized controlled trial. *Am J Clin Nutr* 2011; 93:402-412
- 433 **9.** Momken I, Stevens L, Bergouignan A, Desplanches D, Rudwill F, Chery I, Zahariev A,
434 Zahn S, Stein TP, Sebedio JL, Pujos-Guillot E, Falempin M, Simon C, Coxam V,
435 Andrianjafiniony T, Gauquelin-Koch G, Picquet F, Blanc S. Resveratrol prevents the
436 wasting disorders of mechanical unloading by acting as a physical exercise mimetic in the
437 rat. *FASEB J* 2011; 25:3646-3660
- 438 **10.** Bakker GC, van Erk MJ, Pellis L, Wopereis S, Rubingh CM, Cnubben NH, Kooistra T, van
439 Ommen B, Hendriks HF. An antiinflammatory dietary mix modulates inflammation and

- 440 oxidative and metabolic stress in overweight men: a nutrigenomics approach. *Am J Clin*
441 *Nutr* 2010; 91:1044-1059
- 442 **11.** Ngo Sock ET, Le KA, Ith M, Kreis R, Boesch C, Tappy L. Effects of a short-term
443 overfeeding with fructose or glucose in healthy young males. *The British journal of nutrition*
444 2010; 103:939-943
- 445 **12.** Tappy L, Le KA, Tran C, Paquot N. Fructose and metabolic diseases: new findings, new
446 questions. *Nutrition* 2010; 26:1044-1049
- 447 **13.** Matsuda M, DeFronzo RA. Insulin sensitivity indices obtained from oral glucose tolerance
448 testing: comparison with the euglycemic insulin clamp. *Diabetes Care* 1999; 22:1462-1470
- 449 **14.** Lefai E, Blanc S, Momken I, Antoun E, Chery I, Zahariev A, Gabert L, Bergouignan A,
450 Simon C. Exercise training improves fat metabolism independent of total energy
451 expenditure in sedentary overweight men, but does not restore lean metabolic phenotype. *Int*
452 *J Obes (Lond)* 2017;
- 453 **15.** Yilmaz O, Keser S, Tuzcu M, Guvenc M, Cetintas B, Irtegun S, Tastan H, K S. A Practical
454 HPLC Method to Measure Reduced (GSH) and Oxidized (GSSG) Glutathione
455 Concentrations in Animal Tissues. *Journal of Animal and Veterinary Advances* 2009;
- 456 **16.** Tüközkan N, Erdamar H, I. S. Measurement of Total Malondialdehyde in Plasma and
457 Tissues by High-Performance Liquid Chromatography and Thiobarbituric Acid Assay. *Firat*
458 *Tip Dergisi* 2006;
- 459 **17.** Rifler JP, Lorcerie F, Durand P, Delmas D, Ragot K, Limagne E, Mazue F, Riedinger JM,
460 d'Athis P, Hudelot B, Prost M, Lizard G, Latruffe N. A moderate red wine intake improves
461 blood lipid parameters and erythrocytes membrane fluidity in post myocardial infarct
462 patients. *Mol Nutr Food Res* 2012; 56:345-351
- 463 **18.** Kenny HC, Rudwill F, Breen L, Salanova M, Blottner D, Heise T, Heer M, Blanc S,
464 O'Gorman DJ. Bed rest and resistive vibration exercise unveil novel links between skeletal
465 muscle mitochondrial function and insulin resistance. *Diabetologia* 2017; 60:1491-1501
- 466 **19.** Hansen KB, Vilsboll T, Bagger JI, Holst JJ, Knop FK. Reduced glucose tolerance and
467 insulin resistance induced by steroid treatment, relative physical inactivity, and high-calorie
468 diet impairs the incretin effect in healthy subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 2010; 95:3309-
469 3317

- 470 **20.** Knudsen SH, Hansen LS, Pedersen M, Dejgaard T, Hansen J, Hall GV, Thomsen C,
471 Solomon TP, Pedersen BK, Krogh-Madsen R. Changes in insulin sensitivity precede
472 changes in body composition during 14 days of step reduction combined with overfeeding in
473 healthy young men. *J Appl Physiol* (1985) 2012; 113:7-15
- 474 **21.** Arciero PJ, Smith DL, Calles-Escandon J. Effects of short-term inactivity on glucose
475 tolerance, energy expenditure, and blood flow in trained subjects. *J Appl Physiol* (1985)
476 1998; 84:1365-1373
- 477 **22.** Hansen KB, Vilsboll T, Bagger JI, Holst JJ, Knop FK. Increased postprandial GIP and
478 glucagon responses, but unaltered GLP-1 response after intervention with steroid hormone,
479 relative physical inactivity, and high-calorie diet in healthy subjects. *J Clin Endocrinol*
480 *Metab* 2011; 96:447-453
- 481 **23.** Mikus CR, Oberlin DJ, Libla JL, Taylor AM, Booth FW, Thyfault JP. Lowering physical
482 activity impairs glycemic control in healthy volunteers. *Med Sci Sports Exerc* 2012; 44:225-
483 231
- 484 **24.** Holwerda SW, Reynolds LJ, Restaino RM, Credeur DP, Leidy HJ, Thyfault JP, Fadel PJ.
485 The influence of reduced insulin sensitivity via short-term reductions in physical activity on
486 cardiac baroreflex sensitivity during acute hyperglycemia. *J Appl Physiol* (1985) 2015;
487 119:1383-1392
- 488 **25.** Reynolds LJ, Credeur DP, Holwerda SW, Leidy HJ, Fadel PJ, Thyfault JP. Acute inactivity
489 impairs glycemic control but not blood flow to glucose ingestion. *Med Sci Sports Exerc*
490 2015; 47:1087-1094
- 491 **26.** Jurdana M, Jenko-Praznikar Z, Mohorko N, Petelin A, Jakus T, Simunic B, Pisot R. Impact
492 of 14-day bed rest on serum adipokines and low-grade inflammation in younger and older
493 adults. *Age (Dordr)* 2015; 37:116
- 494 **27.** Bergouignan A, Momken I, Lefai E, Antoun E, Schoeller DA, Platat C, Chery I, Zahariev A,
495 Vidal H, Gabert L, Normand S, Freyssenet D, Laville M, Simon C, Blanc S. Activity energy
496 expenditure is a major determinant of dietary fat oxidation and trafficking, but the
497 deleterious effect of detraining is more marked than the beneficial effect of training at
498 current recommendations. *Am J Clin Nutr* 2013; 98:648-658
- 499 **28.** Blanc S, Normand S, Pachiardi C, Fortrat JO, Laville M, Gharib C. Fuel homeostasis during
500 physical inactivity induced by bed rest. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85:2223-2233

- 501 **29.** Most J, Timmers S, Warnke I, Jocken JW, van Boekschoten M, de Groot P, Bendik I,
502 Schrauwen P, Goossens GH, Blaak EE. Combined epigallocatechin-3-gallate and resveratrol
503 supplementation for 12 wk increases mitochondrial capacity and fat oxidation, but not
504 insulin sensitivity, in obese humans: a randomized controlled trial. *Am J Clin Nutr* 2016;
505 104:215-227
- 506 **30.** Bondia-Pons I, Poho P, Bozzetto L, Vetrani C, Patti L, Aura AM, Annuzzi G, Hyotylainen
507 T, Rivellese AA, Oresic M. Isoenergetic diets differing in their n-3 fatty acid and
508 polyphenol content reflect different plasma and HDL-fraction lipidomic profiles in subjects
509 at high cardiovascular risk. *Mol Nutr Food Res* 2014; 58:1873-1882
- 510 **31.** Annuzzi G, Bozzetto L, Costabile G, Giacco R, Mangione A, Anniballi G, Vitale M, Vetrani
511 C, Cipriano P, Della Corte G, Pasanisi F, Riccardi G, Rivellese AA. Diets naturally rich in
512 polyphenols improve fasting and postprandial dyslipidemia and reduce oxidative stress: a
513 randomized controlled trial. *Am J Clin Nutr* 2014; 99:463-471
- 514 **32.** Hodson L, Bhatia L, Scorletti E, Smith DE, Jackson NC, Shojaee-Moradie F, Umpleby M,
515 Calder PC, Byrne CD. Docosahexaenoic acid enrichment in NAFLD is associated with
516 improvements in hepatic metabolism and hepatic insulin sensitivity: a pilot study. *Eur J Clin*
517 *Nutr* 2017;
- 518 **33.** Narayanankutty A, Kottekkat A, Mathew SE, Illam SP, Suseela IM, Raghavamenon AC.
519 Vitamin E supplementation modulates the biological effects of omega-3 fatty acids in
520 naturally aged rats. *Toxicol Mech Methods* 2017; 27:207-214
- 521 **34.** Mendez L, Ciordia S, Fernandez MS, Juarez S, Ramos A, Pazos M, Gallardo JM, Torres JL,
522 Nogues MR, Medina I. Changes in liver proteins of rats fed standard and high-fat and
523 sucrose diets induced by fish omega-3 PUFAs and their combination with grape
524 polyphenols according to quantitative proteomics. *J Nutr Biochem* 2017; 41:84-97
- 525 **35.** Rodriguez-Ramiro I, Vauzour D, Minihane AM. Polyphenols and non-alcoholic fatty liver
526 disease: impact and mechanisms. *Proc Nutr Soc* 2016; 75:47-60
- 527 **36.** Chorner Z, Barbeau PA, Castellani L, Wright DC, Chabowski A, Holloway GP. Dietary
528 alpha-linolenic acid supplementation alters skeletal muscle plasma membrane lipid
529 composition, sarcolemmal FAT/CD36 abundance, and palmitate transport rates. *Am J*
530 *Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2016; 311:R1234-R1242

- 531 **37.** Chopard A, Hillock S, Jasmin BJ. Molecular events and signalling pathways involved in
532 skeletal muscle disuse-induced atrophy and the impact of countermeasures. *J Cell Mol Med*
533 2009; 13:3032-3050
- 534 **38.** Soni NK, Ross AB, Scheers N, Savolainen OI, Nookaew I, Gabriëlsson BG, Sandberg AS.
535 Eicosapentaenoic and Docosahexaenoic Acid-Enriched High Fat Diet Delays Skeletal
536 Muscle Degradation in Mice. *Nutrients* 2016; 8
- 537

Figure 1

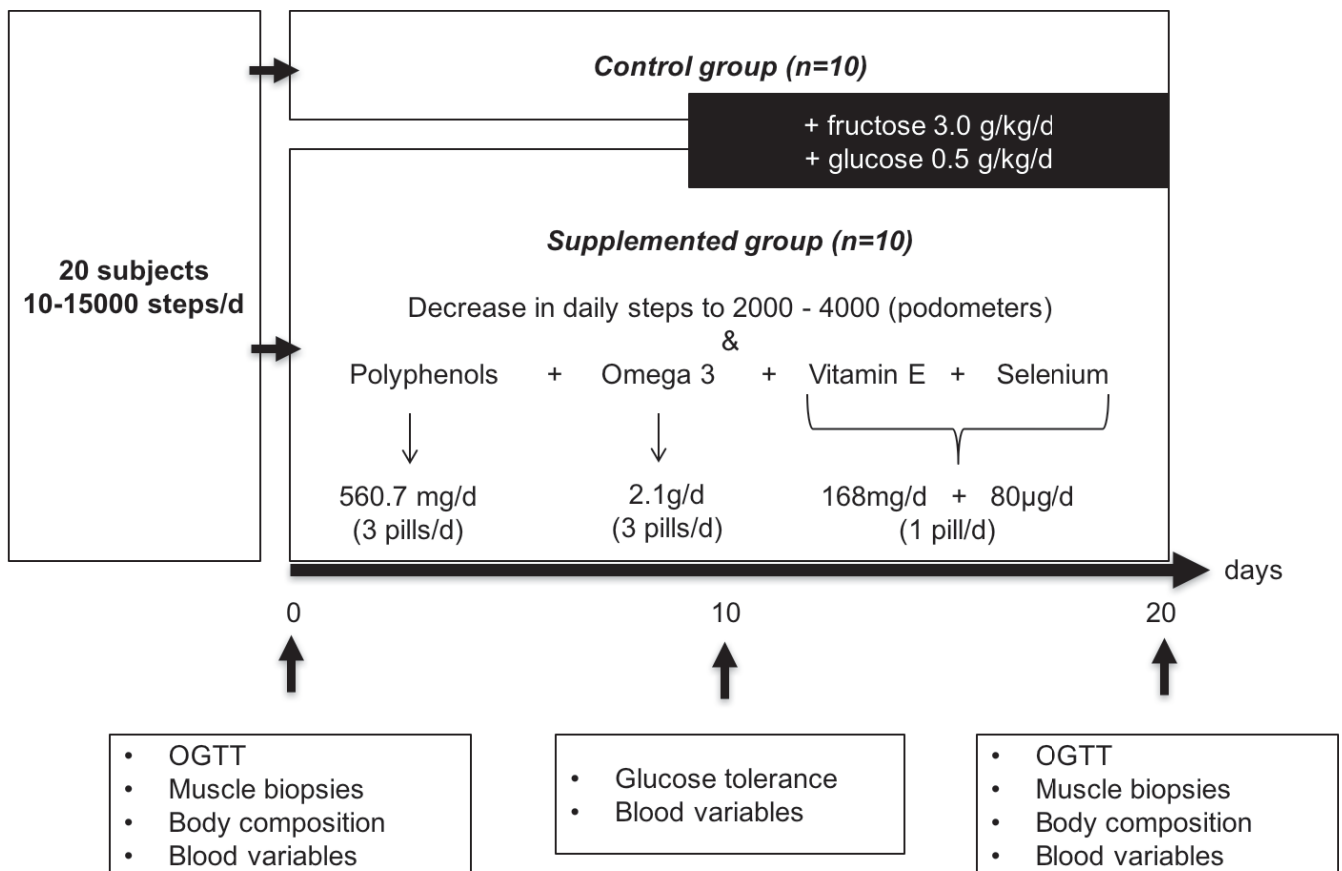


Figure 2

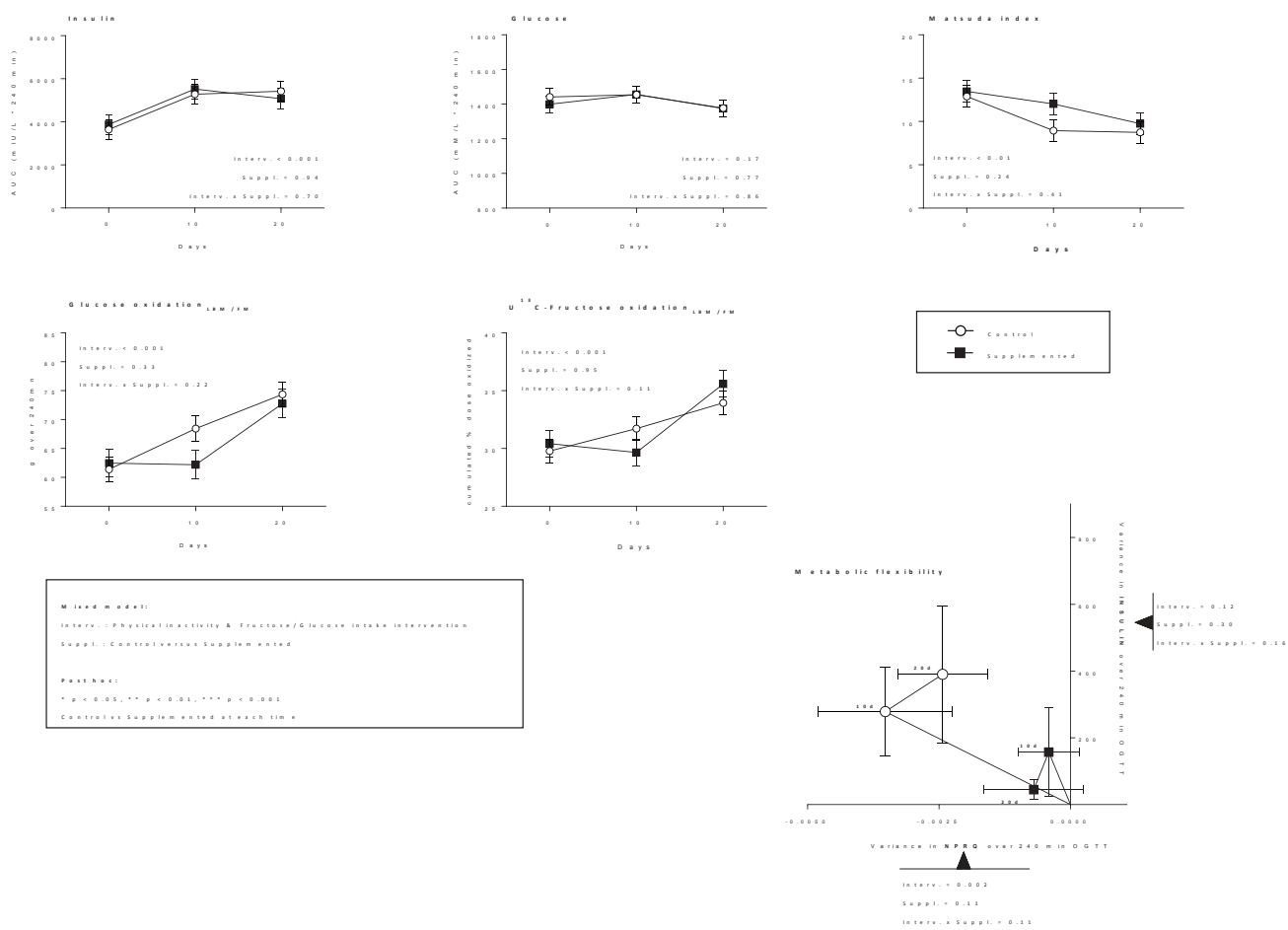
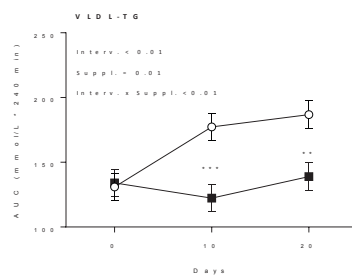
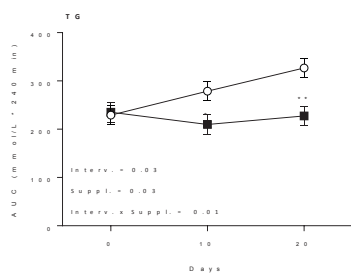


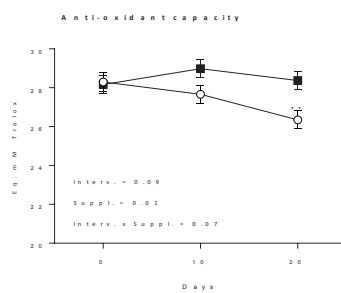
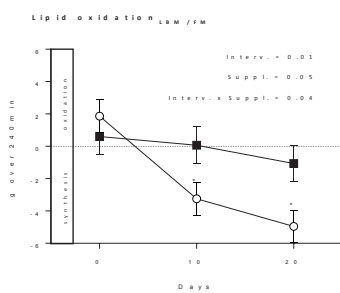
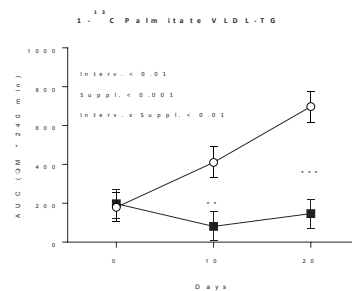
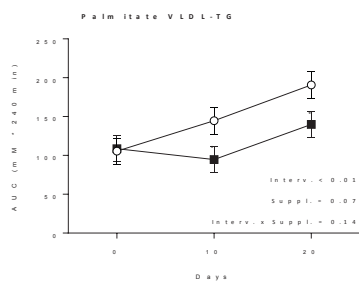
Figure 3



Mixed model:
 Interv.: Physical inactivity & Fructose/Glucose
 Intake Intervention
 Suppl.: Control versus Supplemented

Post hoc:
 * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001
 Control vs Supplemented at each time

○ Control
 ■ Supplemented



HOMA index: Homeostasis Model Assessment of insulin resistance; TG: Triglycerides; HDL: High Density Lipoprotein; LDL: Low Density Lipoprotein; HMW: High Molecular Weight; KRL: total antiradical defense potential; GSH: reduced glutathione; GSSG: oxidized glutathione.

Variables	±								
	Baseline		day 10		day 20		¹ Mixed model		
	Control	Supplemented	Control	Supplemented	Control	Supplemented	Supplementation	Intervention	Interaction
	n=10	n=10	n=10	n=10	n=10	n=10			
Metabolites									
Glucose (mM)	5.58 ± 0.16	5.29 ± 0.12	5.39 ± 0.09	5.22 ± 0.12	5.39 ± 0.11	5.45 ± 0.10	0.83	0.28	0.18
HOMA index	0.76 ± 0.13	0.80 ± 0.13	1.00 ± 0.07	0.84 ± 0.12	1.30 ± 0.21	1.16 ± 0.21	0.15	<0.001	0.54
TG (mmol/L)	0.95 ± 0.06	1.01 ± 0.09	1.05 ± 0.07	0.86 ± 0.07 *	1.26 ± 0.14	0.93 ± 0.09 ***	0.01	0.04	0.01
HDL (mmol/L)	1.31 ± 0.04	1.23 ± 0.06	1.18 ± 0.04	1.29 ± 0.08 ***	1.20 ± 0.06	1.30 ± 0.07 ***	<.0001	0.25	<.0001
LDL (mmol/L)	2.90 ± 0.22	2.69 ± 0.19	2.88 ± 0.21	2.94 ± 0.18	3.08 ± 0.26	3.05 ± 0.25	0.19	<0.01	0.18
Hormones									
Insulin (mU/L)	3.05 ± 0.49	3.40 ± 0.52	4.16 ± 0.29	3.57 ± 0.49	5.33 ± 0.77	4.74 ± 0.85	0.07	<0.0001	0.35
Total adiponectin (µg/mL)	5.19 ± 0.68	6.99 ± 1.54	5.36 ± 0.94	7.27 ± 1.04	6.73 ± 1.05	9.22 ± 1.33	0.29	<0.001	0.75
HMW adiponectin (µg/mL)	2.93 ± 0.43	4.18 ± 0.74	3.08 ± 0.41	4.60 ± 0.66	3.99 ± 0.64	6.27 ± 0.85 *	0.15	<.0001	0.05
Oxidative stress markers									
Malondialdehyde (µg/mL)	0.78 ± 0.05	0.70 ± 0.07	0.67 ± 0.05	0.81 ± 0.05	0.69 ± 0.08	0.74 ± 0.05	0.27	0.79	0.22
KRL (mEq trolox)	24.16 ± 1.16	23.38 ± 0.89	23.09 ± 0.84	23.70 ± 0.81	22.72 ± 1.00	22.26 ± 0.64	0.54	0.13	0.48
GSH	143.0 ± 19.7	227.5 ± 51.2	146.2 ± 15.0	229.9 ± 21.6	227.7 ± 71.9	292.2 ± 74.2	0.53	0.17	0.99
GSSG	334.9 ± 22.3	313.5 ± 28.9	329.0 ± 10.85	339.4 ± 25.6	331.4 ± 14.5	343.1 ± 26.9	0.21	0.79	0.27
GSH/GSSG ratio	0.42 ± 0.05	0.86 ± 0.28	0.45 ± 0.05	0.72 ± 0.10	0.64 ± 0.16	0.85 ± 0.18	0.52	0.27	0.77

Means are ± SEM.

¹Mixed models are adjusted on baseline. Tukey post hoc *p<0.05, **p<0.01 vs control.

Variables	±								
	Baseline		day 10		day 20		¹ Mixed model		
	Control	Supplemented	Control	Supplemented	Control	Supplemented	Supplementation	Intervention	Interaction
	n=10	n=10	n=10	n=10	n=10	n=10			
Weight (kg)	77.5 ± 2.3	76.5 ± 2.2	77.6 ± 2.2	76.7 ± 2.3	77.8 ± 2.1	76.9 ± 2.4	0.89	0.28	0.87
Fat mass (kg)	16.9 ± 1.4	17.8 ± 1.8	17.2 ± 1.4	18.0 ± 1.7	17.4 ± 1.3	18.3 ± 1.4	0.44	<0.001	0.74
Fat mass (%)	21.9 ± 1.4	23.4 ± 2.0	22.3 ± 1.4	23.8 ± 2.0	22.6 ± 1.3	24.1 ± 2.0	0.58	<0.001	0.89
Lean Body mass (kg)	56.5 ± 1.5	54.7 ± 1.7	56.5 ± 1.4	54.5 ± 1.8	56.4 ± 1.4	54.4 ± 1.9	0.87	0.32	0.92
Daily steps	13032 ± 875	14952 ± 1720	2511 ± 235	2664 ± 360	2645 ± 331	3009 ± 298	0.73	<.0001	0.40

Means are ± SEM. ¹Mixed models are adjusted on baseline.

SUPPLEMENTAL DATA

Dietary cocktail composition

The dietary cocktail was established by the company Spiral (Dijon, France) which is part of the “Pôle National de Compétitivité Vitagora Gout-Nutrition-Santé”. The dietary cocktail associated XXS (a mixture of natural polyphenolic compounds -rich in quercetin- from plant extracts, enriched in resveratrol (including derivatives), a complex of vitamin E and Selenium from organic origin (Solgar®) and omega-3 fatty acids (Omacor®, Pierre Fabre). Altogether, the dietary cocktail brought daily 530mg of bioactive polyphenol compounds; 120,7mg of flavonols, 68mg of phenylpropanoids, 41mg of trace stilbenes, 46mg of hydroxycinnamic acids, 141mg of flavanols and 110,6mg of flavanones; 168mg of vitamin E, 80µg of selenium and 2,1g of omega-3 fatty acids comprising eicosapentaenoic acid (EPA) ethyl ester [EPA: 46 %] and docosahexaenoic acid ethyl ester [DHA: 38 %].

Muscle analysis

Immunohistochemical classification of muscle fibers and cross-sectional area measurements: Transverse serial cross sections (10 µm thick) of *Vastus Lateralis* samples were obtained using a cryostat at -25°C (HM-560, Microm H), and mounted onto glass microscope slides. Before labeling, sections were dried and fixed for 10 min in acetone. Sections were then washed in phosphate buffered saline (PBS), blocked and permeabilized with 0.1% Triton-X100 and 20% horse serum. For muscle fiber typing and CSA determination, sections were incubated with anti-MyHC primary antibodies (anti-slow (I) MyHC, BA-D5, Developmental Studies Hybridoma Bank, 1:10; anti-fast (II) MyHC, M4276, Sigma-Aldrich, 1:200), and anti-fast (IIA) MyHC, SC-71, Developmental Studies Hybridoma Bank, 1:10) for 1 h at 37°C, followed by washes in PBS and incubation with the secondary antibodies (ALEXA 488, A11029, Invitrogen, 1:800; ALEXA 568, A11031, Invitrogen, 1:800) for 1 h. Fiber typing was manually determined, and the fiber sizes were analyzed with ImageJ software (1.46r version). A total of approximately 300 myofibers per sample were thus measured in double-immunostained pre- and post-DI VL cryosections.

Protein expression

Muscle samples were homogenized in 10 volumes of lysis buffer (50 mM Tris-HCl [pH 7.5], 150 mM NaCl, 1 mM EGTA, 1 mM EDTA, 100 mM NaF, 5 mM Na₃VO₄, 1% Triton X-100, 1% SDS, 40 mM β-glycerophosphate and protease inhibitor mixture [P8340; Sigma-Aldrich]) and centrifuged at 10,000 g for 10 min (4°C). Sixty micrograms of protein extract was loaded into Stain-Free 4-20% precast gels (4568095; Bio-Rad) before electrophoretic transfer onto nitrocellulose membranes (Bio-Rad; Trans-Blot Turbo Blotting System). After transfer, the membranes were blocked with 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, and 0.1% Tween 20 (TBS-T) containing 5% skimmed milk or BSA and incubated overnight at 4°C with primary antibodies. The membranes were then incubated for 1 h with a peroxidase-conjugated secondary antibody. The immunoblots were revealed using a Pierce ECL kit (32106; Thermo Scientific), and proteins were visualized by enhanced chemiluminescence using the ChemiDoc Touch Imaging System and quantified with Image Lab™ Touch Software (version 5.2.1). Stain-Free technology or red Ponceau or GAPDH were used as loading control.

Antibodies:

	Antibody	Reference	Dilution	Source
Primary	Ubiquitin	sc-8017	1/3000	Santa Cruz
	Mitofusine	sc-30366	1/200	Santa Cruz
	MuRF-1	sc-27642	1/500	Santa Cruz
	TNF alfa	sc-52746	1/200	Santa Cruz
	p-AKT ser 473	4060	1/1000	Cell Signaling
	Akt Total	9272	1/1000	Cell Signaling
	p-GSK3 α/β Serine 21/9	9331	1/1000	Cell Signaling
	GAPdh (14C10)	2118	1/5000	Cell Signaling
	PGC1 Alfa	AB3242	1/1000	EMD Millipore
	HSP90*	Sc13119	1/1000	Santa Cruz
	NRF2*	Ab62352	1/1000	Abcam
	CATALASE*	Sc50508	1/1000	Santa Cruz
	CBR1*	Ab174852	1/1000	Abcam
	AKR7A2*	Ab155528	1/1000	Abcam
	FATP1*	Sc25541	1/1000	Santa Cruz
Secondary	Mouse	sc-2005	1/4000	Santa Cruz
	Rabbit	sc-2004	1/4000	Santa Cruz
	Rabbit	170-6515	1/10000	Biorad
	Mouse*	172-1011	1/10000	BioRad
	Rabbit*	172-1019	1/10000	BioRad

* used together as primary and secondary antibodies

CHAPITRE 4 : Discussion générale et perspectives

L'alitement prolongé de longue durée est largement utilisé pour simuler les effets de l'impesanteur sur divers systèmes physiologiques, en particulier pour étudier le système musculo-squelettique. En effet, l'alitement prolongé avec des volontaires sains est l'analogue le plus courant pour la simulation d'impesanteur et pour tester des contre-mesures pour la perte osseuse, l'atrophie musculaire et cardiaque, l'intolérance orthostatique et la capacité musculaire. C'est grâce au modèle de l'alitement que de grands progrès ont été réalisés dans le développement et le test des contre-mesures pour maintenir la santé et le bien-être des équipes spatiales. Malheureusement, tous les analogues terrestres doivent affronter la force de gravité constante. Cependant, des résultats récents suggèrent que l'alitement est moins fiable pour d'autres systèmes physiologiques importants liés au vol spatial de longue durée de vie, comme la répartition des fluides, la dysfonction spinale ou encore les risques liés au rayonnement (Williams *et al.*, 2009).

Ainsi, l'alitement prolongé a été validé comme un modèle de simulation fiable pour à l'évaluation des changements musculaires associés à l'hypokinésie et à l'hypodynamie (Adams *et al.*, 2003; Chopard *et al.*, 2005; Pavy-Le Traon *et al.*, 2007). Cependant, le modèle d'immersion sèche (DI) est connu pour reproduire plus précisément les effets de l'impesanteur sur le système musculo-squelettique que le modèle d'alitement prolongé (Navasiolava *et al.*, 2011; L. Treffel, Dmitrieva, *et al.*, 2016). Ainsi, les expériences d'immersion sèche à court terme sont suffisantes pour induire un déconditionnement musculaire et devraient permettre à la communauté scientifique d'élucider les mécanismes précoces de mise en place du déconditionnement musculaire au travers des réseaux de gènes ou voies signalétiques musculaires activées. En effet, comme précisé dans la revue de littérature, la perte de masse musculaire est un phénomène exponentiel avec une décroissance importante dans les premiers jours. Or les événements cellulaires et moléculaires se déroulant durant les premiers jours sont encore incomplètement connus. La compréhension des mécanismes moléculaires sous-jacents à ce processus est cruciale pour l'identification de contre-mesures efficaces capables de limiter le déconditionnement du muscle squelettique.

Les différentes conditions expérimentales que nous avons pu développer lors de ces travaux de thèse associées au déconditionnement musculaire se traduisent par une décroissance de la masse musculaire, correspondant à des changements importants durant les différentes périodes du déconditionnement musculaire (Bodine, Latres, *et al.*, 2001; Cros *et al.*, 1999).

Ici, nous avons eu la chance et l'opportunité d'avoir accès à 3 conditions expérimentales induisant le déconditionnement musculaire: l'immersion sèche (3 jours), la réduction chronique d'activité (20 jours) et l'alitement prolongé (60 jours). Néanmoins, les résultats concernant l'alitement prolongé doivent être interprétés avec précautions vu le faible nombre de sujet à ce jour (n=5/groupe). Bien qu'étant des modèles différents, ces 3 expérimentations nous permettent de discuter nos résultats d'un point cinétique du déconditionnement musculaire.

Atrophie et déconditionnement musculaire

Cette cinétique nous permet ainsi de retrouver ce qui est décrit depuis de nombreuses années concernant la perte de volume des fibres musculaires. En effet, la décroissance exponentielle du volume des fibres musculaires décrite (Cros *et al.*, 1999) se retrouve à travers nos 3 études : -11% concernant les 3 jours de DI, -19% pendant les 20 jours de réduction d'activité et aussi de -19% durant l'alitement prolongé de 60 jours. Ceci confirme l'aspect exponentiel, et non linéaire de la perte du volume musculaire décrit dans la littérature. Ce constat est également appuyé par l'analyse IRM effectuée indiquant une diminution de seulement 2% du compartiment antérieur de la cuisse lors de 3 jours d'immersion sèche. Par exemple, un alitement de 7 jours a été associé à une diminution de 3% du volume de la cuisse antérieure, un alitement de 20 jours associé à une diminution de 8%, 30 jours avec 10%, 60 jours avec 14% et 90 jours avec 18% (Alkner & Tesch, 2004a; Ferrando *et al.*, 1995; Kawakami *et al.*, 2001; Mulder *et al.*, 2006). Ces études antérieures confirment également que la perte de muscle due au déconditionnement est bien exponentielle.

L'alitement prolongé (Ferrando *et al.*, 1996) de périodes comprises entre 10 et 42 jours conduisent généralement à un taux de perte musculaire d'environ 0,5-0,6% par jour (Ferrando *et al.*, 1995; Glover *et al.*, 2008; Kortebein *et al.*, 2007; Thom *et al.*, 2001) (, avec une diminution supérieure de la force musculaire comprise entre 0,3% (A. D. LeBlanc *et al.*, 1992; Paddon-Jones *et al.*, 2004) et 4,2% (Thom *et al.*, 2001) par jour. Nos résultats, même non significatif, sont du même ordre de grandeur puisque l'alitement prolongé est caractérisé

par une perte moyenne de 0,38% par jour de l'aire de section des fibres musculaires. Ainsi nous retrouvons le même effet que le décrit la littérature.

Déconditionnement et balance protéique musculaire

Au cours d'une période de déconditionnement prolongé (supérieure à 10 jours), l'atrophie des muscles squelettiques est susceptible d'être principalement provoquée la diminution de la synthèse des protéines musculaires; alors que les changements concernant la dégradation des protéines musculaires ne sembleraient pas être primordiale (Wall, Dirks, & van Loon, 2013). Nos résultats sur les expérimentations de réduction d'activité et d'alitement prolongé sont en accord avec la littérature car nous n'avons pas trouvé de changements significatifs dans l'expression des E3 ligases majeures du système UPS, MuRF-1 et Atrogin-1. Cependant, lors d'un déconditionnement à court terme (<10 jours), il est probable qu'une augmentation de la dégradation des protéines musculaires et un déclin simultané de la synthèse des protéines musculaires convergent pour déclencher rapidement le processus d'atrophie du système musculo-squelettique. Nous avons retrouvé dans l'étude DI (Chapitre 2) ces effets précoces caractériser par une augmentation significative de l'ubiquitination des protéines de 18% mais aussi de MuRF-1 d'environ 40%. Une étude d'immobilisation de 4 jours, de même durée, a également montré une augmentation de l'expression de MuRF-1 et d'Atrogin-1 (Suetta *et al.*, 2012). De plus nous retrouvons également le même pourcentage moyen de perte de force musculaire (3,5% environ) même si le modèle d'immobilisation est connu pour également être drastique.

Dans nos études, nous avons étudié la balance protéique, atteinte dans le contexte du déconditionnement musculaire, au travers des acteurs classiques à savoir la voie Akt/mTOR versant synthèse et les E3 ligases Murf 1 et MaFbx versant protéolyse. Toutefois sur le versant protéolyse, la littérature s'enrichie sans cesse de nouveaux acteurs. Récemment, plusieurs études ont examiné la façon dont la voie TWEAK-Fn14-NF- κ B était régulée dans différentes situations d'atrophie musculaire. L'activation de la voie est déclenchée par la liaison de TWEAK à son récepteur Fn14 dont l'expression inductible est le mode majeur de régulation de la voie, capable de réguler de nombreuses réponses cellulaires, y compris la prolifération, la différenciation, l'apoptose (Sato, Ogura, & Kumar, 2014). Même si cela n'a été démontré qu'*in vitro* sur C2C12, TWEAK est maintenant connu pour activer les voies

signalétiques et protéolytiques sous la dépendance de NF- κ B telles que l'ubiquitine protéasome et les caspases (Paul *et al.*, 2012; Vucic, 2013).

Altérations de la force et des propriétés viscoélastique du quadriceps

Nos résultats concernant la perte de force du quadriceps d'environ 11% après 3 jours seulement d'immersion sèche sont étroitement similaires à la diminution d'environ 15% de la perte de force signalée après 5 semaines d'alitement prolongé (Krainski *et al.*, 2014) ou encore après 10 jours d'alitement chez les personnes âgées (Kortebein *et al.*, 2007; Kortebein *et al.*, 2008). La littérature rapporte globalement une perte de force maximale volontaire du quadriceps jusqu'à 30% pour un alitement de 3 mois (Alkner & Tesch, 2004a). Ainsi, les expériences DI génèrent une plus grande perte de force que les études d'alitement, mais proche de celle des expériences d'immobilisation dans lesquelles le déconditionnement musculaire est également plus drastique que lors de l'alitement.

Au delà d'objectiver classiquement la perte de force sur les protocoles de déconditionnement musculaire, nous avons eu l'opportunité de disséquer la cinétique de production de force et de relaxation ainsi que d'autres paramètres caractérisant la fonction musculaire à l'aide de l'outil Myoton. Toujours centrés sur les premiers jours du déconditionnement, nous avons mis en évidence, sur l'expérimentation DI, une altération plus importante de la cinétique de montée en force que celle de la relaxation (Demangel *et al.*, 2017).

D'autre part, notre étude a démontré des altérations importantes concernant les paramètres viscoélastiques du muscle avec la diminution de la rigidité musculaire (-10%), la fréquence d'oscillation (-10%) associée à l'augmentation du décrétement logarithmique (+31%).

Changements myotypologiques :

La diminution significative de la CSA globales des fibres musculaires, d'environ 10% après 3 jours d'immersion sèche, pourrait principalement être attribuée aux fibres musculaires lentes (MyHC I). Nous avons également observé une diminution de la CSA des fibres de types lentes d'environ 22% après le protocole de réduction d'activité, mais curieusement aucune modification de la CSA de ce même type de fibres sur le protocole d'alitement prolongé. Nos résultats sont conformes à la littérature démontrant que 3 jours de DI peuvent induire une atrophie musculaire de 9% et 7 jours de DI, une atrophie musculaire d'environ 18%

(Litvinova *et al.*, 2004; Navasiolava *et al.*, 2011). Encore une fois, ce résultat souligne l'ampleur de la perte musculaire précoce et non linéaire.

Les changements myotypologiques sont également classiquement rapportés dans les expériences de déconditionnement musculaire, et nous avons pu, après seulement 3 jours de DI, observer des changements significatifs, à savoir une diminution du pourcentage de fibres IIA et une augmentation de la proportion de fibres hybrides co-exprimant les types I et IIX MyHC. Ainsi, comme cela a été démontré dans les années 1990 par le groupe de Baldwin, l'inactivité à court terme a eu une incidence négative sur la transcription du gène MyHC ? et MyHC ? (Baldwin *et al.*, 2013; Caiozzo *et al.*, 1998). Comme identifié par Haddad et al. (1993) suite à « the 9 day Space Lab 1 Mission », le muscle Vaste Intermédiaire a été atrophié de ~ 22%. Cette atrophie a été associée à une perte de l'isoforme de myosine de type I et du type rapide IIA, qui ont été contrebalancé/compensé par l'augmentation de l'expression des isoformes de type IIX plus rapides. Concernant, notre étude d'alitement prolongé, il s'est reproduit la même chose, avec une diminution de la CSA des fibres de type I de 22%, et avec l'apparition de fibres de type IIX (+2% environ). En comparaison, l'immersion sèche a induit une diminution de 11% de la CSA des fibres de types I. Nous avons observé ainsi une diminution de 14% de la proportion de fibres de type I lors du protocole de réduction d'activité. Dans les trois cas, on observe une apparition significative de fibres IIX ou de co-expression dites hybrides : 1,3% pour la DI ; 1,1% (groupe CTL) et 1,8% (groupe CKT) pour la réduction d'activité et 2,32% pour l'alitement. Ceci illustre le fait que l'initiation des changements s'opèrent très tôt et à des degrés différents suivant le type de myosine (MyHC). Il aurait été intéressant toujours le protocole d'immersion sèche, d'investiguer les différentes voies signalétiques mises avant dans le maintien du phénotype lent. En effet, Bigard et al. avait montré que l'activation de la voie Calcineurine/NFATc3/MEF /GATA était nécessaire au maintien du phénotype lent exprimé dans le muscle soléaire (Bigard *et al.*, 2000).

Déconditionnement musculaire et remodelage de la jonction neuromusculaire

La perte de force caractéristique du déconditionnement musculaire est souvent majorée par rapport à la perte de masse musculaire. Parmi les causes de cette perte de force non directement liée à la diminution de la surface de section des fibres, des troubles de la conduction du message nerveux et notamment le remodelage de la jonction neuromusculaire mais aussi la perte de motoneurone, ont été avancés. En effet, dans le contexte du

vieillesse des études antérieures avaient noté que le nombre de fibres musculaires et d'unités motrices diminuaient chez les rongeurs et les hommes (Caccia *et al.*, 1979; Edstrom & Larsson, 1987). D'autre part, il a été suggéré que la diminution du nombre de fibres musculaires serait due à la perte d'unités motrices entières et à la réintégration incomplète des fibres musculaires dénervées par les neurones moteurs restants (Caccia *et al.*, 1979; Edstrom & Larsson, 1987) résultant d'une diminution de la régénération axonale chez le rat âgé (Drahota & Gutmann, 1961). L'augmentation de l'expression de NCAM à la surface des fibres musculaires des animaux âgés repérée dans ces études confirme cette hypothèse.

Dans notre contexte du déconditionnement musculaire et parmi les adaptations repérées on retrouve plusieurs éléments en faveur d'un remodelage de la jonction neuromusculaire et d'une perte de l'innervation des motoneurones alpha (Midrio, 2006). L'étude d'Arentson-lantz *et al.* (2016), par exemple, ont rapporté une augmentation significative des fibres musculaires NCAM⁺ (de 2% à 4%) après 14 jours d'alitement (Arentson-Lantz *et al.*, 2016).

Nos résultats ont révélé que seulement 3 jours de DI pouvaient induire une augmentation faible mais significative du nombre de myofibres positives au NCAM⁺, ce qui suggère que la perte d'innervation motrice serait un phénomène s'initiant très précocement en réponse à l'hypoactivité sévère et pouvant expliquer l'inadéquation entre perte de masse et perte de force.

Nous n'avons utilisé dans nos études que le marqueur de surface NCAM/CD56 qui est exprimé au niveau de la fibre lorsque celle-ci est dénervée. Or la littérature propose d'autres marqueurs du processus de remodelage de la jonction neuromusculaire et de la dénervation des fibres tels que MuSK, Lrp4, Dok7 ou encore Rapsyn (Tintignac *et al.*, 2015).

ANNEXES

Curriculum Vitae

CURRICULUM VITAE

ETAT CIVIL

Nom : Rémi Demangel
Né le 11 Mai 1990 (27 ans)

Adresse : Résidence Les Terrasses de l'Aqueduc
(Domicile) 453 Rue de la Croix de Lavit
Bâtiment A – Appartement A15
34090 Montpellier

Adresse : UMR-866 Dynamique Musculaire et Métabolisme
(Laboratoire) INRA
2 Place Viala
34060 Montpellier Cedex 1

Téléphone : 06 09 65 04 06

E-mail : demangel.remi@gmail.com

Secourisme : Sauveteur Secouriste du Travail, depuis le 03 Octobre 2017

TITRES ET DIPLOMES

2014 Master Recherche Sciences du Mouvement Humain – Parcours Physiologie de l'Exercice
Mention passable – Université de Montpellier (34)

2013 **Admissible** au CAPEPS (UFR STAPS, Orléans, 45)

2012 **Licence STAPS** – Parcours Entraînement Sportif.
Mention Assez bien – Université d'Orléans (45)

Licence STAPS – Parcours Éducation & Motricité.
Mention Assez bien – Université d'Orléans (45)

2009 **Licence 1 Mathématiques-Informatique** option Mathématiques Appliquées -
Université d'Orléans.

2008 **Baccalauréat** Scientifique option mathématiques.
Mention passable - Romorantin-Lanthenay, Loir-et-Cher (41).

PARCOURS PROFESSIONNEL

Oct. 2014 – Sept. 2017 **Doctorat**, STAPS-Physiologie de l'exercice (Cofinancement UM/CNES) – Ecole doctorale Sciences du Mouvement Humain, **Laboratoire d'accueil** : UMR INRA 866, Dynamique Musculaire et Métabolisme. **Dirigée par** Angèle Chopard et Guillaume Py. **Titre** : Hypoactivité, microgravité et déconditionnement musculaire : étude des effets chez l'homme dans un modèle d'immersion sèche.

Janv. 2014 - Juin 2014 **Master 2 SMH**, UMR INRA 866 DMEM, Montpellier. Maîtres de stage : Mme Angèle Chopard et M. Guillaume Py.
- Déconditionnement musculaire et accumulation d'infiltrations graisseuses.

- Oct 2012 - Juin 2013** **Master 1** SMH, UMR INRA 866 INRA, Montpellier. Maitres de stage : Mme Angèle Chopard et M. Guillaume Py.
- L'adiposité musculaire : analyse morphométrique.
- Sept. 2011 - Juin 2012** **Licence 3** STAPS – Entraînement Sportif; Accompagnement sur une équipe Nationale Championnat de France masculine, USM Saran Handball. Maitres de stage : M. Nicolas Raimbault, M. Marc Lévêque et M. Sébastien Péralta.
-Influence du Modèle de VROOM et du Leadership à travers différents moments de résilience.
- Mars 2012 - Avril 2012** **Licence 3** STAPS – Éducation Motricité ; Enseignant EPS en ZEP, Collège Jean Pelletier, Orléans. Maîtres de stage : Mme Magalie Boizumault et M. Jean-Marie Tarade.
-Enseignement à temps complet : Classe de 6^{ème}, 4^{ème} et 3^{ème}.
- Sept. 2010 - Juin 2011** **Licence 2** STAPS – Entraînement Sportif; Accompagnement sur une équipe Nationale Championnat de France féminine, CJF Fleury Loiret Handball. Maîtres de stage : Madame Emmanuelle Patout et M. Romuald Bercher.
- Adaptations offensive et défensive face à la blessure : influence du projet de jeu de l'équipe fanion aux équipes réservistes.
- Mars 2012 - Avril 2012** **Licence 2** STAPS – Éducation Motricité ; Enseignant EPS en Lycée, Lycée Benjamin Franklin, Orléans. Maître de stage : Mme Emmanuelle Patout
- Enseignement 4 heures par semaine pendant 8 semaines: Classe Terminale ES et STG.

ENCADREMENT D'ÉTUDIANT

- 2016-2017** M. Florian Colmagne, Master 2 STAPS Préparation Physique et Réathlétisation – Science et Techniques du Coaching Sportif: *Maintien des qualités cardio-pulmonaires chez le sportif blessé aux membres inférieurs : effet d'un entraînement High-Intensity Interval Training (HIIT) vs. un entraînement en endurance sur les membres supérieurs.* **Co-encadrement avec Mme Angèle Chopard.**

ENSEIGNEMENTS UNIVERSITAIRES

- 2016/2017** UFR STAPS, Université de Montpellier, Travaux Dirigés en Licence 1 : Anatomie et biomécanique du mouvement humain. (20h).

COMPÉTENCES ET SAVOIRS-FAIRE TECHNIQUE

Expérimentations humaines :

Exploitation et traitement de biopsies musculaires humaines au sein de 3 projets européens de déconditionnement musculaire humain (Immersion sèche de 3 jours, réduction d'activité de 20 jours et alitement prolongé de 60 jours) de Novembre 2015 à Septembre 2017.

Expérimentations animales :

Dissection et traitement de muscles de rongeurs (souris et rat) au sein d'un projet d'hypoactivité sur la souris (Hindlimb Unloading de 14 jours) de Mai 2015 à Septembre 2016.

Biochimie et Biologie moléculaire

Maîtrise de l'extraction, dosage et quantification de protéines par Western-Blot et d'ARNm par RT-qPCR sur tissus musculaires animaux et humains.

Expérience animale Maîtrise du gavage oesophagien de souris lors de protocoles expérimentaux et dissection musculaire.

Histologie **Co-responsable du laboratoire Histologie au sein de l'UMR-866 Dynamique Musculaire et Métabolisme avec Mme Laurence Pessemesse.**

Maîtrise de l'inclusion de tissus musculaires animaux et humains pour coupes cryostat ou inclusion en paraffine.

Maîtrise de coupes cryostat (8-12 µm) sur microtome, immunomarquage paraffine et cryostat. Maîtrise des colorations Hématoxyline/Éosine, Oil Red O, Rouge Sirius, Azorubine.

Mise au point et rédaction de protocoles expérimentaux pour l'unité (Automatisation de calcul d'aire de section de fibres, immunomarquage de myosines sur muscles humain et animal.)

Statistiques Intérêts et maîtrise des statistiques fondamentales. Intérêt très important pour les biostatistiques et l'analyse bioinformatique. Analyse et traitement de RNA-seq et micro-arrays. Connaissances et utilisation des logiciels *Genepattern*, *IPA*, *Ingenuity*, *R*, *ImageJ*, *Matlab* (à réactiver).

PRINCIPALES PUBLICATIONS

Allan F. Pagano, Thomas Brioché, Coralie Arc-Chagnaud, **Rémi Demangel**, Angèle Chopard; Guillaume Py. 3 days of human skeletal muscle disuse promote fatty infiltrations development. Article soumis. Révisions mineures dans *The Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle*. IF : 9,69.(Pagano *et al.*, 2017)

Demangel, R.*, Treffel, L.*, Py, G., Brioché, T., Pagano, A. F., Bareille, M. P., . . . Millet, C. (2017). Early structural and functional signature of 3-day human skeletal muscle disuse using the dry immersion model. *J Physiol*. doi:10.1113/JP273895

Pagano, A. F., Brioché, T., Arc-Chagnaud, C., **Demangel, R.**, Chopard, A., & Py, G. (2017). Short-term disuse promotes fatty acid infiltration into skeletal muscle. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*. doi:10.1002/jcsm.12259

PUBLICATIONS EN COURS DE SOUMISSION

Anthony Damiot*, **Rémi Demangel***, John Noone*, Isabelle Chery, Alexandre Zahariev, Sylvie Normand, Thomas Brioché, François Crampes, Isabelle de Glizinski, Etienne Lefai, Angèle Chopard, Jocelyne Drai, Delphine Collin-Chavagnac, Martina Heer, Guillemette Gauquelin-Koch, Michel Prost, Patrick Simon, Guillaume Py, Audrey Bergouignan, Chantal Simon, Stéphane Blanc, Donal J. O’Gorman. A nutrient cocktail prevents the deterioration in lipid metabolism induced by 20 days of daily steps reduction and fructose overfeeding. Article soumis dans *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* ; IF : 5,45.

Tintignac L, Pessemesse L, Blanchet E, Cortade F, Jublanc E, **Demangel R**, Py G, Sar C, Cabello G, Wrutniak-Cabello C, Casas F. Thyroid Hormone Receptor α regulates the duration of skeletal muscle regeneration in response to acute injury. Article soumis dans *The Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle*, IF :9,69

LISTES DES COMMUNICATIONS

Rémi Demangel, Thomas Brioché, Allan Pagano, Coralie Arc-Chagneau, Laurence Pessemesse, Anne Bonnieu, Robin Candau, Guillaume Py & Angèle Chopard. Early functional signature in human after 3 days of dry immersion. 13^{ème} édition de la journée de l'École Doctorale des Sciences du Mouvement Humain (communication affichée), 02 Juin 2017, Montpellier – France.

Rémi Demangel, Loic Treffel, Guillaume Py, Thomas Brioché, Allan F. Pagano, Claude Gharib, Angèle Chopard, Catherine Millet. Early functional signature of human vastus lateralis muscle after 3 days of dry immersion. 37th Annual International Gravitational Physiology Meeting (**Communication orale**) May 28th – June 2st 2017, Zvenigorod-Russie.

Rémi Demangel, Thomas Brioché, Allan F. Pagano, Coralie Arc-Chagneau, Laurence Pessemesse, Anne Bonnieu, Robin Candau, Guillaume Py, Angèle Chopard. Skeletal

Rémi Demangel, Thomas Brioché, Allan F. Pagano, Marie-Pierre Bareille, Arnaud Beck, Robin Candau, Guillaume Py, Angèle Chopard. Remodeling of skeletal muscle after a short-term inactivity. 12ème Journée de l'École Doctorale des Sciences du Mouvement Humain (JEDSMH) (communication affichée), 27 Mai 2016, Marseille, France.

Allan F. Pagano, Coralie Arc-Chagnaud, Thomas Brioché, **Rémi Demangel**, Angèle Chopard et Guillaume Py. Regeneration of skeletal muscle during chronic inactivity: role of inflammation status on muscle fatty infiltration development. 12ème édition de la journée de l'École Doctorale des Sciences du Mouvement Humain (**Communication orale**), 27 Mai 2016, Marseille-France.

Allan F. Pagano, **Rémi Demangel**, Thomas Brioché, Robin Candau, Claude A. Dechesne, Christian Dani, Anne Bonniou, Guillaume Py et Angèle Chopard. Muscle regeneration with intermuscular adipose tissue (Iwase *et al.*)(Isaac *et al.*) accumulation is modulated by mechanical constraints. 1ère journée scientifique de l'Institut du Mouvement Humain et Cybernétique (communication affichée), 5 Novembre 2015, Montpellier-France.

Rémi Demangel, Thomas Brioché, Allan Pagano, Robin Candau, Anne Bonniou, Guillaume Py & Angèle Chopard. Microgravity and prevention of muscle deconditioning. 1ère journée scientifique de l'Institut du Mouvement Humain et Cybernétique (communication affichée), 5 Novembre 2015, Montpellier-France.

Allan F. Pagano, **Rémi Demangel**, Thomas Brioché, Robin Candau, Anne Bonniou, Guillaume Py et Angèle Chopard. Régénération musculaire, infiltrations graisseuses et effets de l'hypoactivité. 16ème Congrès international de l'Association des Chercheurs en Activités Physiques et Sportives (**Communication orale**), 26-28 Octobre 2015, Nantes – France.

Allan F. Pagano, **Rémi Demangel**, Thomas Brioché, Robin Candau, Claude A. Dechesne, Christian Dani, Anne Bonniou, Guillaume Py et Angèle Chopard. Muscle regeneration with intermuscular adipose tissue accumulation is modulated by the level of mechanical constraints. 36th Annual International Gravitational Physiology Meeting (**Communication orale**), 7 au 12 Juin 2015, Ljubljana-Slovenia.

- **Catégorie : Méthodologie et outils de la thèse**

Mieux s'organiser pour réussir son doctorat (19 octobre 2015)

21 heures enregistrées par : Collège Doctoral Languedoc Roussillon.

Rédiger et exposer ses travaux de thèses (26 octobre 2015)

6 heures enregistrées par : Collège Doctoral Languedoc Roussillon.

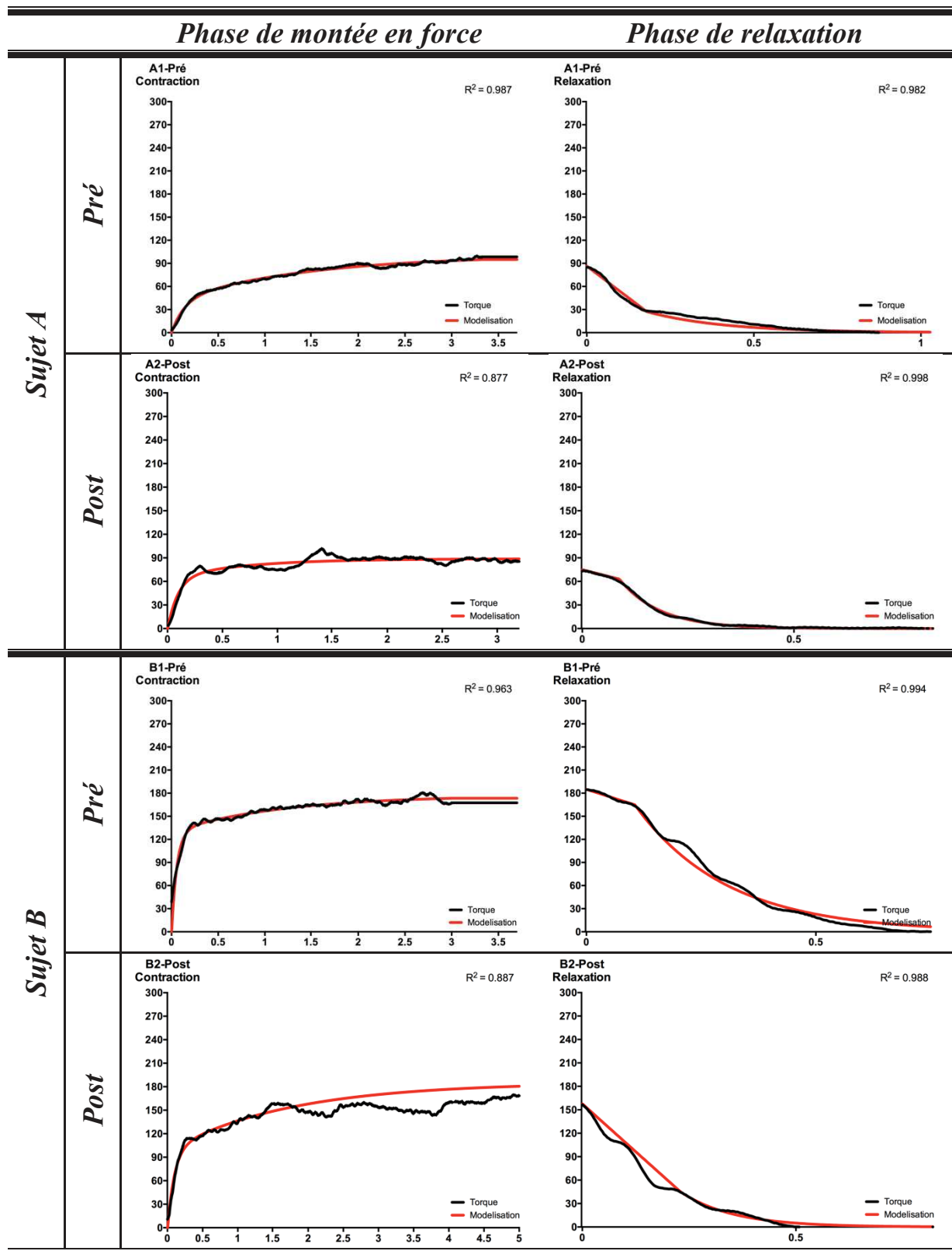
Réussir à bien rédiger une note de synthèse (22 juillet 2015)

14 heures enregistrées par : Collège Doctoral Languedoc Roussillon.

Total du nombre d'heures pour la catégorie Méthodologie et outils de la thèse : 41 h

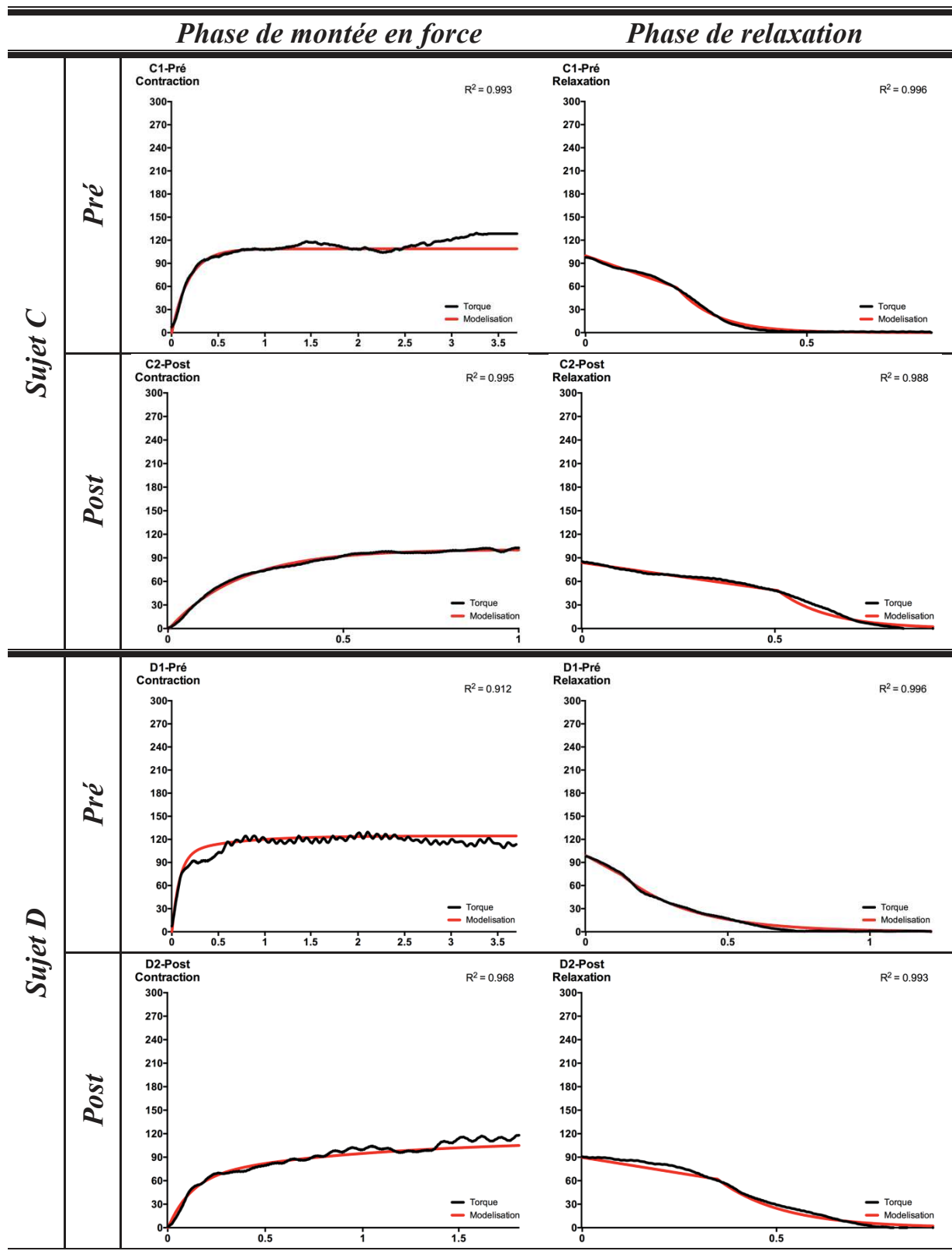
Total participation : 129 heures / 9 modules

**Modélisations mathématiques des tests de
force maximale isométrique volontaires des
sujets d'immersion sèche**



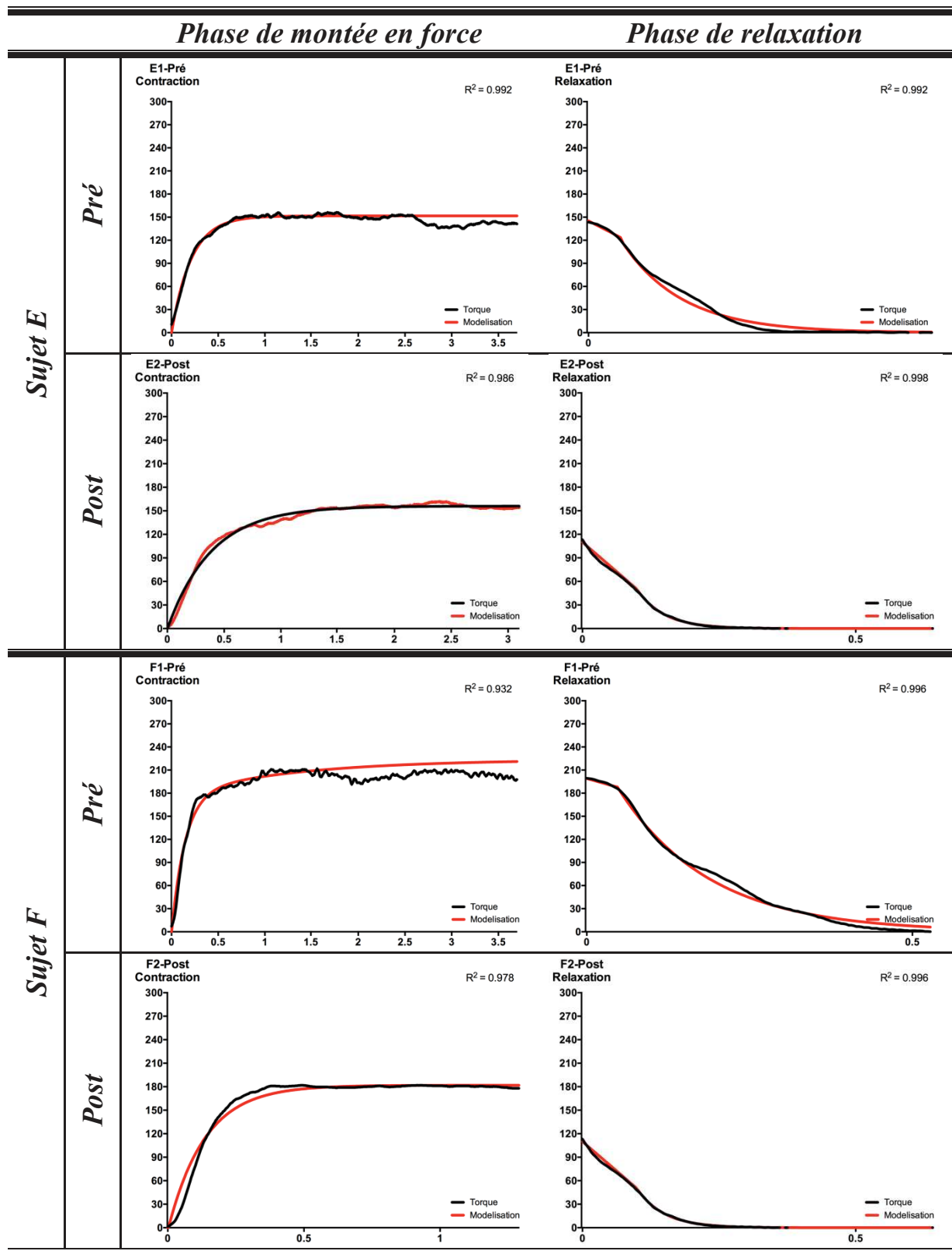
Exemple de modélisations mathématiques (signal rouge) des tests de contraction maximale volontaire isométrique (signal noir) concernant les sujets A et B.

Exemples de modélisations mathématiques sur 2 sujets correspondants à la phase de montée en force et à la phase de relaxation avant et après 3 jours d'immersion sèche. Les coefficients de corrélations sont indiqués en haut à droite. La courbe noire correspond au signal brut de chaque sujet, tandis que la courbe rouge correspond à la modélisation mathématique calculée.



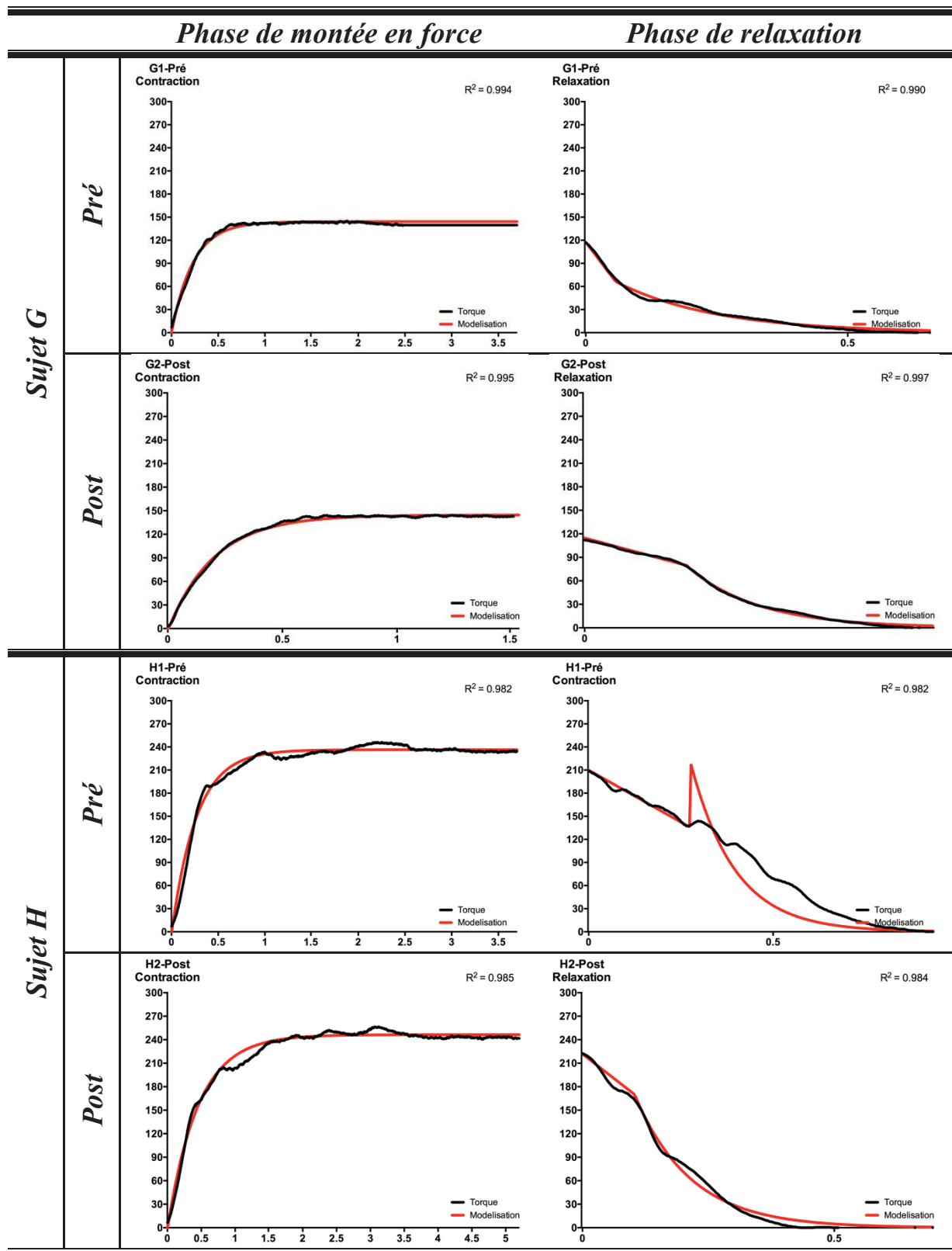
Exemple de modélisations mathématiques (signal rouge) des tests de contraction maximale volontaire isométrique (signal noir) concernant les sujets C et D.

Exemples de modélisations mathématiques sur 2 sujets correspondants à la phase de montée en force et à la phase de relaxation avant et après 3 jours d'immersion sèche. Les coefficients de corrélations sont indiqués en haut à droite. La courbe noire correspond au signal brut de chaque sujet, tandis que la courbe rouge correspond à la modélisation mathématique calculée.



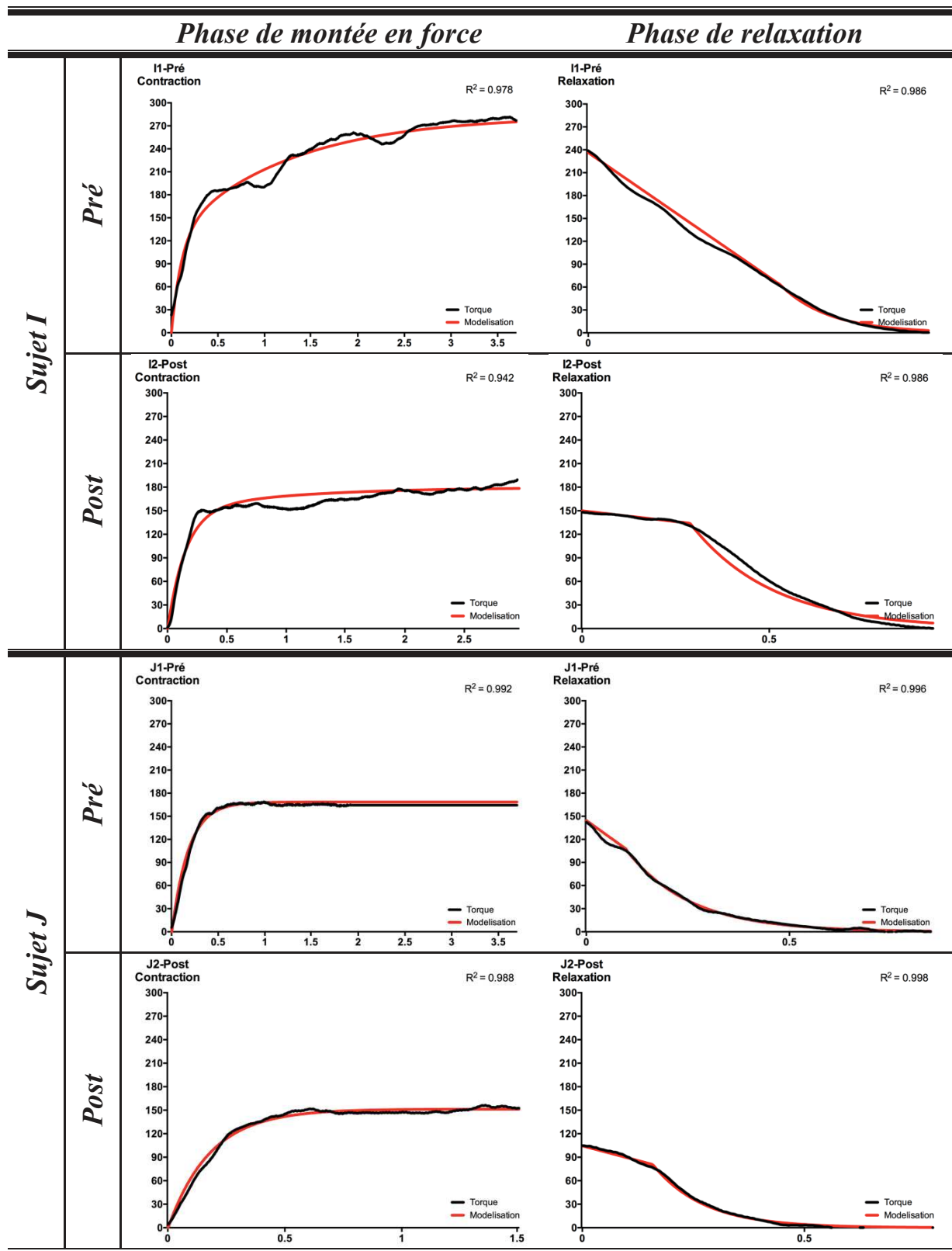
Exemple de modélisations mathématiques (signal rouge) des tests de contraction maximale volontaire isométrique (signal noir) concernant les sujets E et F.

Exemples de modélisations mathématiques sur 2 sujets correspondants à la phase de montée en force et à la phase de relaxation avant et après 3 jours d'immersion sèche. Les coefficients de corrélations sont indiqués en haut à droite. La courbe noire correspond au signal brut de chaque sujet, tandis que la courbe rouge correspond à la modélisation mathématique calculée.



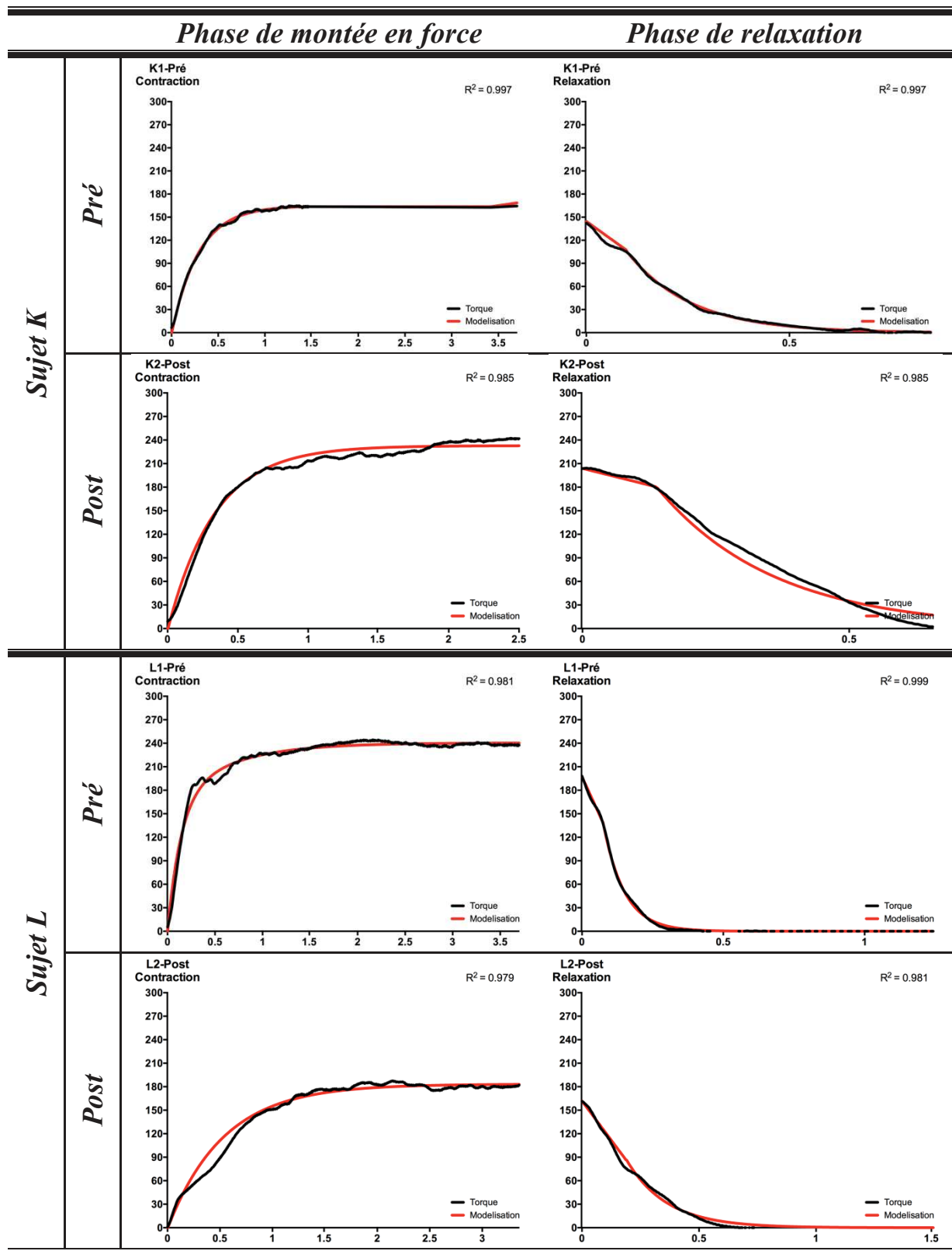
Exemple de modélisations mathématiques (signal rouge) des tests de contraction maximale volontaire isométrique (signal noir) concernant les sujets G et H.

Exemples de modélisations mathématiques sur 2 sujets correspondants à la phase de montée en force et à la phase de relaxation avant et après 3 jours d'immersion sèche. Les coefficients de corrélations sont indiqués en haut à droite. La courbe noire correspond au signal brut de chaque sujet, tandis que la courbe rouge correspond à la modélisation mathématique calculée.



Exemple de modélisations mathématiques (signal rouge) des tests de contraction maximale volontaire isométrique (signal noir) concernant les sujets I et J.

Exemples de modélisations mathématiques sur 2 sujets correspondants à la phase de montée en force et à la phase de relaxation avant et après 3 jours d'immersion sèche. Les coefficients de corrélations sont indiqués en haut à droite. La courbe noire correspond au signal brut de chaque sujet, tandis que la courbe rouge correspond à la modélisation mathématique calculée.



Exemple de modélisations mathématiques (signal rouge) des tests de contraction maximale volontaire isométrique (signal noir) concernant les sujets K et L.

Exemples de modélisations mathématiques sur 2 sujets correspondants à la phase de montée en force et à la phase de relaxation avant et après 3 jours d'immersion sèche. Les coefficients de corrélations sont indiqués en haut à droite. La courbe noire correspond au signal brut de chaque sujet, tandis que la courbe rouge correspond à la modélisation mathématique calculée.

**Chronogramme entier de l'alitement
prolongé de 60 jours s'étant déroulé de
Janvier 2017 / Avril 2017**

Phase de « Base Data Collection » - BDC

BDC-14	BDC-13	BDC-12	BDC-11	BDC-10	BDC-9	BDC-8
URINES	URINES	URINES Δ	URINES Δ	URINES** et ****	URINES***	URINES
TRU-CO (20')	Blood	Blood	Blood	Blood		Blood
BCD DEXA-BC(30')	STA-VAS	BLAB-St test		BLA-Lipid Test		STA-VAS
RMR	STA-CEC (1h30-2h)			24h		STA-CEC (1h30-2h)
BCD-DGI (15')					REY-SVS (1h)	
BCD-Posturo (15')					BLAB-St test	BCD-VO2max (1h)
TAG tâche virtuelle (1h) training		BCD-MVC (1h30)			CAI-Hol ECG	CAI-Hol ECG
BCD-3DpQCT(1h)	MRI (60') (Trudel+ Metabolism)	BCD-Fatigue			STA-CBT début (36h)	
	TRU-Selles	ARC-SL-EEG	ARC-SL-EEG	BCD-Quest (15')	THO-CGMS+prick	THO-CGMS+prick
ARC-AW+4Quest	ARC-AW+4Quest	THO-CGMS+prick	THO-CGMS+prick	THO-CGMS+prick	THO-CGMS+prick	THO-CGMS+prick
		TRU-Selles	TRU-Selles	TRU-Selles	TRU-Selles	TRU-Selles
		ARC-AW+4Quest	ARC-AW+4Quest	ARC-AW+4Quest	ARC-AW+4Quest	ARC-AW+4Quest

Chronogramme de l'alitement prolongé de BDC-14 à BDC-8

BDC-7	BDC-6	BDC-5	BDC-4	BDC-3	BDC-2	BDC-1
URINES	URINES	URINES	URINES* Δ	URINES* Δ	URINES	URINES
	Blood	Blood	Blood	Blood	Blood	Blood
STA-CBT fin (36h)	BIOPSIE 1 muscle	BCD DEXA-BC(30')	BCD-PV (30')	URS-Os/BS-Os	RMR	TRU-CO (20')
FIE- μ dialysis	Biopsie de gras 1	BCD DEXA-Os(30')			CAI-Hol ECG	
3h30	McDO-CLAMP 3h	STA-VAS			BCD-Tilt_LBNP (1h30)	
FIE-US	BIOPSIE 2 muscle	STA-Cog task (1h)	BCD-DGI (15')		BLAB-St test	
FIE-Echo cardio	Biopsie de gras 2		BCD-Posturo (15')		BLAB-LEG (2h)	Eye Exam (2h)
TAG tâche virtuelle (2h)		BCD-PV (fam)			LEG-MRI (30')	
		BCD-Tilt_LBNP(fam)				
		STA-MRIf (60 min)	ARC-SL-EEG	ARC-SL-EEG		
THO-CGMS+prick	THO-CGMS+prick		BCD-Quest (15')			
ARC-AW+4Quest	ARC-AW+4Quest					
		ARC-AW+4Quest	ARC-AW+4Quest	ARC-AW+4Quest	ARC-AW+4Quest	ARC-AW+4Quest

Chronogramme de l'alitement prolongé de BDC-7 à BDC-1

Phase de « Head Down Tilt » - HDT

HDT1	HDT2	HDT3	HDT4	HDT5	HDT6	HDT7
URINES Δ	URINES Δ	URINES**	URINES	URINES	URINES	URINES
Blood	Blood	Blood				Blood
RMR		FIE-μdialysis	RMR	TRU-CO (20 ')		BCD DEXA-BC(30')
HDT	STA-Cog task (1h)	3h30		CAI-Hol ECG	CAI-Hol ECG	STA-CEC (1h30-2h)
BLAB-LEG (90')		FIE-US				
BLAB-BaroRef (1h)		FIE-Echo cardio				
TAG tâche virtuelle (2h)	PIO (15')	PIO (15')				
PIO (15')						
ARC- SL-EEG	ARC- SL-EEG	BCD-Quest (15')				
ARC- AW+4Quest	ARC- AW+4Quest	ARC- AW+4Quest	ARC- AW+4Quest	ARC- AW+4Quest	ARC- AW+4Quest	ARC- AW+4Quest

Chronogramme de l'alitement prolongé de HDT-1 à HDT-7

HDT8	HDT9	HDT10	HDT11	HDT12	HDT13	HDT14
URINES	URINES ****	URINES	URINES	URINES	URINES	URINES*
	Blood					Blood
BLAB-LEG (90')	BLA-Lipid Test 24h		TRU-CO (20 ')			
BLAB-BaroRef (1h)						
		BCD-Quest (15')				
			TRU-Selles	TRU-Selles	TRU-Selles	
ARC- AW+4Quest	ARC- AW+4Quest	ARC- AW+4Quest	ARC- AW+4Quest	ARC- AW+4Quest	ARC- AW+4Quest	ARC- AW+4Quest

Chronogramme de l'alitement prolongé de HDT-8 à HDT-14

HDT15	HDT16	HDT17	HDT18	HDT19	HDT20	HDT21
URINES*	URINES	URINES	URINES	URINES	URINES●	URINES
Blood					Blood	CAI-Hol ECG
STA-cogTask (1h)	BLAB-LEG (90')				URS-Os/BS-Os	STA-CBT fin (36h)
	BLAB-BaroRef (1h)				RMR	
					FIE-US FIE-Echo cardio	
			PIO (15')		BCD-3DpQCT(1h)	
		BCD-Quest (15')		STA-CBT début (36h)		
ARC- AW+4Quest	ARC- AW+4Quest	ARC- AW+4Quest	ARC- AW+4Quest	ARC- AW+4Quest	ARC- AW+4Quest	ARC- AW+4Quest

Chronogramme de l'alitement prolongé de HDT-15 à HDT-21

Phase de « Head Down Tilt » - HDT

HDT22	HDT23	HDT24	HDT25	HDT26	HDT27	HDT28
URINES	URINES	URINES	URINES	URINES Δ	URINES Δ	URINES
CAI-Hol ECG				Blood	Blood	
BCD DEXA-BC(30')						
BLAB-LEG (90')						
BLAB-BaroRef (1h)						
				ARC-SL-EEG	ARC-SL-EEG	
		BCD-Quest (15')				
ARC- AW+4Quest	ARC- AW+4Quest	ARC- AW+4Quest	ARC- AW+4Quest	ARC- AW+4Quest	ARC- AW+4Quest	ARC- AW+4Quest

Chronogramme de l'alitement prolongé de HDT-22 à HDT-28

HDT29	HDT30	HDT31	HDT32	HDT33	HDT34	HDT35
URINES*	URINES* et **	URINES	URINES	URINES	URINES	URINES
	Blood	Blood				
BLAB-LEG (90')	TRU-CO (20 ')	STA-CEC (1h30-2h)				
	TAG tâche virtuelle (2h)					
				PIO (15')		
		BCD-Quest (15')				
	TRU-Selles	TRU-Selles	TRU-Selles			
ARC- AW+4Quest	ARC- AW+4Quest	ARC- AW+4Quest	ARC- AW+4Quest	ARC- AW+4Quest	ARC- AW+4Quest	ARC- AW+4Quest

Chronogramme de l'alitement prolongé de HDT-29 à HDT-35

HDT36	HDT37	HDT38	HDT39	HDT40	HDT41	HDT42
URINES	URINES	URINES	URINES	URINES•	URINES	URINES
	BCD DEXA-BC (30')			Blood		
BLAB-LEG (90')	BCD DEXA-Os (30')			URS-Os/BS-Os		
BLAB-BaroRef (1h)						
				FIE-US FIE-Echo cardio		
				BCD-3DpQCT(1h)		
		BCD-Quest (15')		BCD-BDI Quest		
ARC- AW+4Quest	ARC- AW+4Quest	ARC- AW+4Quest	ARC- AW+4Quest	ARC- AW+4Quest	ARC- AW+4Quest	ARC- AW+4Quest

Chronogramme de l'alitement prolongé de HDT-36 à HDT-42

Phase de « Head Down Tilt » - HDT

HDT43	HDT44	HDT45	HDT46	HDT47	HDT48	HDT49
URINES	URINES*	URINES*	URINES	URINES	URINES	URINES****
		Blood			RMR	Blood
BLAB-LEG (90')		STA-Cog task (1h)				BLA-Lipid Test
BLAB-BaroRef (1h)						24h
					PIO (15')	
		BCD-Quest (15')				
ARC- AW+4Quest	ARC- AW+4Quest	ARC- AW+4Quest	ARC- AW+4Quest	ARC- AW+4Quest	ARC- AW+4Quest	ARC- AW+4Quest

Chronogramme de l'alitement prolongé de HDT-43 à HDT-49

HDT50	HDT51	HDT52	HDT53	HDT54	HDT55	HDT56
URINES	URINES	URINES	URINES* Δ	URINES* et *** et Δ	URINES	URINES
		STA-CBT fin (36h)	Blood	Blood	FIE-μdialysis	Blood
			BLAB-LEG (90')		3h30	BIOPSIE 1 muscle
			BLAB-BaroRef (1h)		FIE-US	Biopsie de gras 1
					FIE-Echo cardio	McDO-CLAMP 3h
		LEG-MRI (30')				BIOPSIE 2 muscle
			ARC- SL-EEG	ARC- SL-EEG		Biopsie de gras 2
STA-CBT début (36h)		BCD-Quest (15')	THO-CGMS+prick	THO-CGMS+prick	THO-CGMS+prick	THO-CGMS+prick
ARC- AW+4Quest	ARC- AW+4Quest	ARC- AW+4Quest	ARC- AW+4Quest	ARC- AW+4Quest	ARC- AW+4Quest	ARC- AW+4Quest
						TRU-Selles

Chronogramme de l'alitement prolongé de HDT-50 à HDT-56

Phase de « Head Down Tilt » - HDT et début de la Phase

HDT57	HDT58	HDT59	HDT60	R+0	R+1	R+2
URINES	URINES	URINES	URINES** •	URINES	URINES	URINES
TRU-CO (20')	BCD DEXA-BC (30') BCD DEXA-Os (30')	TAG tâche virtuelle (2h)	Blood URS-Os/BS-Os BCD-PV (30')	Blood	Blood	Blood
			Breakfast STA-CEC (1h30-2h)	CAI-Hol ECG BCD-Tilt_LBNP (1h30) BLAB-St test (35')	CAI-Hol ECG STA-Cog task (1h)	STA-Cog task (1h)
	CAI-Hol ECG	CAI-Hol ECG		BCD-DGI (15') BCD-Posturo (15')	REY-SVS (1h)	TAG tâche virtuelle (2h)
MRI (60') Trudel+ Metabolism					BLAB-St test PIO (15')	
		PIO (15')		BCD- MVC (1h30)	CAI-Hol ECG	PIO (15')
THO-CGMS+prick TRU-Selles	THO-CGMS+prick TRU-Selles	BCD-Quest (15')	BCD-3DpQCT(1h)	BCD-Fatigue	BCD-VO2max (1h)	BCD-Quest (15')
					STA-MRif (60 min)	
ARC- AW+4Quest	ARC- AW+4Quest	ARC- AW+4Quest	ARC- AW+4Quest	ARC- AW+4Quest	ARC- AW+4Quest	ARC- AW+4Quest

Chronogramme de l'alitement prolongé de HDT-57 à R+2

R+3	R+4	R+5	R+6	R+7	R+8	R+9
URINES	URINES	URINES*	URINES*	URINES	URINES	URINES
Blood			Blood	Blood	STA-CBT fin (36h)	Blood
	FIE- μ dialysis 3h30	TRU-CO (20')	RMR	CAI-Hol ECG	CAI-Hol ECG	BCD-PV (30')
BCD-DGI (15') BCD-Posturo (15')	FIE-US FIE-Echo cardio	BCD DEXA-BC (30') BLAB-St test (35') ?		STA-CEC (1h30-2h)		
					REY-SVS (1h)	
		Eye Exam (2h)	STA-CBT début (36h)		BLAB-St test	
		TRU-Selles	TRU-Selles	TRU-Selles		
ARC- AW+4Quest	ARC- AW+4Quest	ARC- AW+4Quest	ARC- AW+4Quest	ARC- AW+4Quest	ARC- AW+4Quest	ARC- AW+4Quest

Chronogramme de l'alitement prolongé de R+3 à R+9

R+10	R+11	R+12	R+13	R+14
URINES Δ	URINES Δ	URINES*	URINES* et **et•	URINES
Blood	Blood		Blood	
		TRU-CO (20')	URS-Os/BS-Os	
		RMR	BCD DEXA-BC(30')	
3h30 FIE-US FIE-Echo cardio		BLAB-LEG (90')	BCD DEXA-Os(30')	
Biopsie muscle			STA-CEC (1h30-2h)	DEPART
			TAG tâche virtuelle (2h)	
ARC- SL-EEG	ARC- SL-EEG		BCD-3DpQCT(1h)	
BCD-Quest (15')				
ARC- AW+4Quest	ARC- AW+4Quest	ARC- AW+4Quest	ARC- AW+4Quest	

Chronogramme de l'alitement prolongé de R+10 à R+14

Phase de « Suivi »

R+30		R+360	R+720
1 mois		1 an	2 ans
URINES*et•		URINES*et•	URINES*et•
Blood		Blood	Blood
URS-Os/BS-Os		URS-Os/BS-Os	URS-Os/BS-Os
TRU-CO (20 ')		TRU-CO (20 ')	TRU-CO (20 ')
RMR		BCD DEXA-Os(30'	BCD DEXA-Os(30'
BCD-3DpQCT(1h)		BCD-3DpQCT(1h)	BCD-3DpQCT(1h)
LEG-US (1h45)			
FIE-US FIE-Echo cardio		FIE-US FIE-Echo cardio	FIE-US FIE-Echo cardio
TRU-MRI (15')		TRU-MRI (15')	TRU-MRI (15')

Chronogramme de l'alitement prolongé à R+30 à R+360 et R+720

BCD Equipe MEDES	DEXA os (hanche, colonne lombaire), BC (Body composition) Questionnaires MVC contraction musculaire maximale isométrique Fatigue musculaire DGI marche Posturographie -équilibre Vo2max test d'effort sur vélo 3DpQCT scanner (poignet, cheville) TILT-LBNP test sur table basculante +dépression de la partie inférieure du corps PV volume plasmatique Urines et Blood pour les marqueurs osseux
---------------------------------	--

Equipe TAGLIABUE	Réalité virtuelle mouvements de la main
-----------------------------	--

Equipe STAHN	CEC enregistrement de l'activité cérébrale et cardio vasculaire CBT enregistrement de la température corporelle Recueil de salive
STAHN	MRI f IRM fonctionnel test de mémorisation

EQUIPE FIELITZ	Ultra son du quadriceps de la cuisse gauche Echographie cardiaque Microdialyse muscle de la cuisse gauche
R+10	Biopsie quadriceps cuisse droite avec equipe Salanova

Equipe BLANC	Test Lipidique
-------------------------	----------------

Equipe ARCHER	Enregistrement electroencéphalographique sommeil -veille AW actiwatch montre enregistrant les mouvements Recueil de salive, Questionnaire sur l'état d'éveil
--------------------------	--

Equipe TRUDEL	CO recueil du monoxyde de carbone dans l'air expiré et dans la chambre Recueil des selles sur 3 jours
--------------------------	--

Equipe THOMPSON	CGMS système d'enregistrement du glucose tissulaire Sonde sous la peau pendant 6 jours Prick = Prélèvements de sang au bout du doigt 2 fois par jour
----------------------------	--

EQUIPE REYNOLDS	SVS stimulation vestibulaire électrique et équilibre
----------------------------	--

LEGENDES

Equipe BLABER	Stand test étude du passage de la position couchée à la position debout Leg électromyographie muscles de la jambe Baroreflexe : ECG, NIRS,SCG
Equipe MACDONALD	Biopsie quadriceps cuisse droite (équipes Salanova, Blanc, Fielitz, Chopard) Biopsie graisse abdominale (équipes Blanc, Thompson) Clamp hyperinsulinique (équipes Blanc, Heer)
Equipe LEGUY	IRM avec produit de contraste US echo doppler des vaisseaux
IRM	Trudel colonne lombaire Blanc muscle , foie Macdonald muscle
MEDES YEUX	Examen des yeux PIO pression intra oculaire
RMR	Calorimétrie
Equipe CAIANI	Holter ECG sur 24h
SANG	Equipes Trudel, Frippiat, Salanova, Heer, Thompson, Archer, Blanc, Macdonald, Stahn, Fielitz, Medes
URINES	Toutes les urines sont recueillies sur 24 heures pour en connaître le volume Jours d'analyse pour les Equipes Heer* ,Frippiat**, Thompson***, Blanc****, BCD●, Archer Δ

Equipes n'apparaissant pas dans le planning

SALANOVA	Sang et biopsies musculaires (Macdonald + FielitzR+10)
FRIPPIAT	Prélèvements de sang
HEER	Sang ,Urines, clamp (Macdonald)
CHOPARD	Biopsies musculaires (Macdonald)

PERIODES

BDC	Baseline Data Collection - Période avant l'alitement	
HDT	Head down test - Période d'alitement	
HDT1	Head down test 1er jour d'alitement	
R	Recovery - Période après l'alitement	

REPAS

Petit déjeuner vers 7h30	Pas de petit déjeuner pour les tests lipidiques et les clamps petit déjeuner décalé après le dexa BC, le RMR, le volume plasmatique
Déjeuner vers 12h30	
Dîner vers 19h30	

**Publication scientifique en collaboration
dans le laboratoire**

ARTICLE 1

Muscle regeneration with intermuscular adipose tissue (IMAT) accumulation is modulated by mechanical constraints

*Allan F. Pagano, Rémi Demangel, Thomas Brioché, Élodie Jublanc, Christelle Bertrand-Gaday, Robin Candau, Claude A. Dechesne, Christian Dani, Anne Bonnieu, Guillaume Py, Angèle Chopard.
(publié le 02 Décembre 2015 dans PlosOne ; IF = 3,06).*

RESEARCH ARTICLE

Muscle Regeneration with Intermuscular Adipose Tissue (IMAT) Accumulation Is Modulated by Mechanical Constraints

Allan F. Pagano¹✉, Rémi Demangel¹✉, Thomas Brioché¹, Elodie Jublanc¹, Christelle Bertrand-Gaday¹, Robin Candau¹, Claude A. Dechesne², Christian Dani², Anne Bonnieu¹, Guillaume Py¹‡, Angèle Chopard¹‡*

1 Université de Montpellier, INRA, UMR866 Dynamique Musculaire et Métabolisme, F-34060, Montpellier, France, **2** Université Nice-Sophia Antipolis, iBV, CNRS UMR7277, INSERM U1091, 06107, Nice, France

✉ These authors contributed equally to this work.

‡ These authors also contributed equally to this work.

* angele.chopard@univ-montp1.fr



Abstract

Sports trauma are able to induce muscle injury with fibrosis and accumulation of intermuscular adipose tissue (IMAT), which affect muscle function. This study was designed to investigate whether hypoactivity would influence IMAT accumulation in regenerating mouse skeletal muscle using the glycerol model of muscle regeneration. The animals were immediately hindlimb unloaded for 21 days after glycerol injection into the tibialis anterior (TA) muscle. Muscle fiber and adipocyte cross-sectional area (CSA) and IMAT accumulation were determined by histomorphometric analysis. Adipogenesis during regenerative processes was examined using RT-qPCR and Western blot quantification. Twenty-one days of hindlimb unloading resulted in decreases of 38% and 50.6% in the muscle weight/body weight ratio and CSA, respectively, in soleus muscle. Glycerol injection into TA induced IMAT accumulation, reaching 3% of control normal-loading muscle area. This IMAT accumulation was largely inhibited in unloading conditions (0.09%) and concomitant with a marked reduction in perilipin and FABP4 protein content, two key markers of mature adipocytes. Induction of PPAR γ and C/EBP α mRNA, two markers of adipogenesis, was also decreased. Furthermore, the protein expression of PDGFR α , a cell surface marker of fibro/adipogenic progenitors, was much lower in regenerating TA from the unloaded group. Exposure of regenerating muscle to hypoactivity severely reduces IMAT development and accumulation. These results provide new insight into the mechanisms regulating IMAT development in skeletal muscle and highlight the importance of taking into account the level of mechanical constraint imposed on skeletal muscle during the regeneration processes.

OPEN ACCESS

Citation: Pagano AF, Demangel R, Brioché T, Jublanc E, Bertrand-Gaday C, Candau R, et al. (2015) Muscle Regeneration with Intermuscular Adipose Tissue (IMAT) Accumulation Is Modulated by Mechanical Constraints. PLoS ONE 10(12): e0144230. doi:10.1371/journal.pone.0144230

Editor: Stephen E Alway, West Virginia University School of Medicine, UNITED STATES

Received: May 21, 2015

Accepted: November 16, 2015

Published: December 2, 2015

Copyright: © 2015 Pagano et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: This work was supported by the Centre National d'Etudes Spatiales (CNES).

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Introduction

The capacity of skeletal muscle to regenerate is a key parameter of its plasticity. A wide variety of stress can induce muscle injuries, including sport traumas, prolonged blood flow disruption or even muscle diseases. After injury, skeletal muscle is able to regenerate through various and high coordinated stages including degeneration, inflammation, and regeneration process [1]. These steps include recruitment of satellite cells (SCs), which are localized between the sarcolemma and the basal lamina of myofibers [2]. Indeed, it is now well known that quiescent satellite cells proliferate, migrate and differentiate into mature myofibers to regenerate injured muscle tissue [3–5]. Numerous studies have already shown that hindlimb unloading (HU), commonly used to mimic hypoactivity and also microgravity [6], induces a loss in SC content and mitotic activity, which disturbs muscle regeneration by reducing growth of the newly formed myofibers [7–9].

The research literature also indicates that abnormal fibrosis and intermuscular adipose tissue (IMAT) accumulation occur, particularly when early regeneration processes are altered, and that this in turn alters muscle function. IMAT is defined as adipocyte accumulation between muscle cells and beneath the muscle fascia, and it should not be confused with intramyocellular triglyceride accumulation [10]. Studies have shown that impaired macrophage function is linked to poor muscle regeneration and IMAT accumulation after freeze-induced [11], ischemic [12, 13], notexin-induced [14] and cardiotoxin-induced [15] injury.

In these regeneration models, little or no IMAT accumulation is naturally observed. Although IMAT does not occur naturally in rodent skeletal muscles, a skeletal muscle regeneration model with IMAT accumulation was developed in rabbit by Kawai et al. [16] and was later used in mice in several studies [17–20]. This regeneration model consists of injecting glycerol into skeletal muscle, and Dani's group was the first to present a detailed characterization of the "glycerol approach" [21]. The model has been used in several studies to investigate IMAT development and its related adipogenic processes and, more recently, to better characterize muscle-resident adipocyte precursors [19, 20, 22]. To our knowledge, the study of Lukjanenko et al. [22] has been the only one to provide a detailed characterization of some of the cellular responses related to this regeneration model in comparison with the more classic cardiotoxin model. Their study clearly showed that the two models induced similar kinetics of skeletal muscle degeneration and regeneration, but they differed with regard to the adipogenic response amplitude. The glycerol model was therefore associated with more mature adipocytes accumulation.

Recently, studies have highlighted the growing importance of muscle-resident mesenchymal stem cells in the regeneration process of skeletal muscle [23, 24]. In particular, fibro/adipogenic progenitors (FAPs), which are mainly positive for the cell surface marker platelet-derived growth factor receptor alpha (PDGFR α or CD140a), play an important role in efficient regeneration. In a healthy but damaged muscle, FAPs proliferate, phagocytize necrotic debris, and increase the proliferation of SCs without differentiating into adipocytes [19, 25]. In muscle disuse or pathological conditions, such as Duchenne muscular dystrophy, FAPs proliferate and differentiate into adipose and/or fibrous tissue [26, 27]. Parallel to the decrease in SC content [28, 29], FAPs in this case lead to an accumulation of IMAT [10, 20].

Although it is clear that disturbed regeneration promotes IMAT accumulation and impaired skeletal muscle function [30], there is a lack of data evaluating the effects of prolonged hypoactivity on IMAT accumulation during regeneration processes. In a closed context, the study of Jarvinen and Lehto [31] conducted in rats showed that immobilization following contusion injury limited the size of the connective tissue area formed within the injury site. One might therefore ask whether a period of hypoactivity would modulate IMAT development in a

regeneration model characterized by IMAT development. Our study was designed to investigate and characterize the effects of prolonged hypoactivity induced by hindlimb unloading on IMAT development and accumulation in the glycerol model of muscle regeneration. Rodent HU was set up immediately after glycerol injection to ensure hypoactivity during the entire period of the regeneration process. Our results clearly showed that IMAT accumulation in regenerating muscle was substantially lowered with unloading conditions, with a subsequent decrease in FAP recruitment.

Materials and Methods

Ethics statement

This study was approved by the Committee on the Ethics of Animal Experiments of Languedoc Roussillon in accordance with the guidelines from the French National Research Council for the Care and Use of Laboratory Animals (CEEA-LR-14002). All efforts were made to minimize animal suffering.

Animals

Experiments were carried out on 6-month-old C57BL6J/CBA female mice ($n = 36$; mean body mass = $25.4\text{g} \pm 0.44$) from our own stock. Animals were maintained on a 12h/12h light-dark cycle and provided with food and water ad libitum. Experiments were performed at 22°C .

Experimental procedures and muscle sampling

Experimental procedures were performed under anesthesia using isoflurane inhalation. In accordance with the study of Pisani et al. [21], the mice were injected with $25\mu\text{l}$ of 50% v/v glycerol in the right tibialis anterior (TAg) and with saline solution in the contralateral tibialis anterior (TA). Two experimental groups were formed: hindlimb-unloaded (HU, $n = 6$) and control (CTL, $n = 6$), for 21 days. Tail-suspended experiments were conducted with suspension cages and the protocol used in other studies [32, 33]. At the end of the 21 days of unloading or control conditions, *soleus* (SOL) and *extensor digitorum longus* (EDL) hindlimb muscles were rapidly dissected out and immediately frozen in isopentane cooled with liquid nitrogen and then stored at -80°C . For the first set of experiments, TAg and TA muscles were also rapidly dissected out and immediately fixed overnight in 4% paraformaldehyde solution at room temperature and then paraffin-embedded. For the second and third set of experiments, TAg and TA from CTL and HU animals were dissected out and rapidly frozen in liquid nitrogen for quantification of mRNA and protein content, as described elsewhere.

Histology

Transverse serial sections of SOL and EDL muscles ($9\mu\text{m}$ thick) were obtained at -20°C using a cryostat and sections were subjected to hematoxylin-eosin staining for subsequent cross-sectional area (CSA) measurements.

TA and TAg muscles were fixed in 4% neutral-buffered formalin (24h) and paraffin-embedded. The paraffin-embedded tissues were sectioned ($3\mu\text{m}$ thick) every $50\mu\text{m}$ over the entire muscle depth, and sections were processed by hematoxylin/eosin/saffron (H/E/S) staining. Stained slides were digitalized with the NanoZoomer slide scanner with a x40 objective (Hamamatsu) for subsequent muscle fibers and adipocytes CSA evaluation. Images were analyzed with ImageJ[®] (1.46r version) software to measure the CSA.

Immunohistochemistry

The immunohistochemistry protocol was globally performed as previously described [34]. Briefly, mouse colon (positive control) and TAg muscle sections were deparaffinized, rehydrated, and incubated for antigen retrieval in EDTA buffer at 100°C for 10 min. Sections were incubated in 0.3% H₂O₂ for 20 min and endogenous biotins were blocked using the Avidin-Biotin Blocking kit (Vector Laboratories, CliniSciences). Nonspecific antibody binding was blocked by incubation with TBS containing 20% normal goat serum for 30 min at RT. Sections were then incubated ON at 4°C with rabbit anti-PDGFR α diluted at 1:250 or non-specific rabbit IgG (Vector Laboratories, CliniSciences) at the same concentration. Antibody binding was revealed by the streptavidin/biotin-peroxydase complex method using ABC Vectastain kit and the peroxidase substrate DAB (Vector Laboratories, Clinisciences).

RNA extraction and real-time polymerase chain reaction (RT-qPCR)

Total RNAs were isolated from homogenate muscle samples using the RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit following the manufacturer's instructions (Qiagen). RNA concentration was determined by spectrophotometric analysis (Eppendorf AG, Hamburg, Germany), and integrity was checked by the OD_{260nm}/OD_{280nm} absorption ratio (>1.7). Reverse transcription reaction was performed with 2 μ g of total RNA using the RevertAid First Strand cDNA Synthesis kit (Thermo Scientific) according to the manufacturer's instructions. qPCR analysis was performed in a MiniOpticon detection system (Bio-Rad, Hercules, CA) with 10 μ L of KAPA SYBR Fast Universal Readymix (CliniSciences), 300nM of both forward and reverse primers, 2 μ L of diluted cDNA template and water to a final volume of 20 μ L. The forward and reverse primers used to amplify genes are listed in Table 1. All PCRs were performed in duplicate using the following cycle parameters: 30s at 98°C, 40 cycles of 1s at 95°C and 15s at 60°C. Relative mRNA levels were normalized to ribosomal protein S9 (rpS9) and cyclophilin A housekeeping gene levels, which were unaffected by treatments. Results are expressed using the comparative cycle threshold (C_T). The relative changes in the level of a specific gene were calculated with the $\Delta\Delta C_T$ formula.

Protein isolation and Western blotting

The Western blot protocol was performed as previously described [35]. Briefly, muscle samples were homogenized in 10 volumes of lysis buffer (50mM Tris-HCl pH7.5, 150mM NaCl, 1mM EGTA, 100mM NaF, 5mM Na₃VO₄, 1% Triton X-100, 40mM β -glycerophosphate and protease inhibitor mixture (P8340; Sigma-Aldrich)) and centrifuged at 10.000g for 10 min (4°C). 60 μ g of protein extracts were loaded on SDS-polyacrylamide gels before electrophoretic transfer onto a nitrocellulose membrane (Bio-Rad). After transfer, membranes were blocked with 50mM Tris-HCl pH7.5, 150mM NaCl, and 0.1% Tween 20 (TBS-T) containing 5% skimmed milk or BSA and incubated overnight at 4°C with primary antibodies. Membranes were incubated for 1 h with a peroxidase-conjugated secondary antibody. Immunoblots were revealed using a Pierce ECL kit (32106; Thermo Scientific) and proteins were visualized by enhanced chemiluminescence and quantified with ImageJ[®] (1.46r version) software. β -actin was used as a loading control.

Antibodies

Anti-PDGFR α (#3174), anti-perilipin (#9349), anti-FABP4 (#3544) and anti-adiponectin (#2789) primary antibodies were purchased from Cell Signaling and used at 1:500. Anti- β -actin (sc-81178) primary antibody was purchased from Santa Cruz and used at 1:2000. Anti-

Table 1. Real-time PCR primers.

Gene	Forward	Reverse	Amplicon size
C/EBP α	GACCAGAAAGCTGAGTTGTGAG	CCACAAAGCCCAGAAACCTA	69 bp
C/EBP β	CTCCAGGTAGGGGCTGAAGT	TTTAGACCCATGGAAGTGCC	150 bp
Cyclophilin A	TTCTCCTTTCACAGAATTATCCA	CCGCCAGTGCCATTATGG	75 bp
MyoD	AGCACTACAGTGGCGACTCA	GGCCGCTGTAATCCATCAT	75 bp
myogenin	ACAGGCCTTGCTCAGCTC	CGCTGTGGGAGTTGCATT	102 bp
Pax7	GCTACCAGTACAGCCAGTATG	GTCACCTAAGCATGGGTAGATG	328 bp
PDGFR α	AAGACCTGGGCAAGAGGAAC	GAACCTGTCTCGATGGCACT	67 bp
PPAR γ	GTGCCAGTTTCGATCCGTAGA	GGCCAGCATCGTGTAGATGA	142 bp
rpS9	CGGCCCGGGAGCTGTTGACG	CTGCTTGCGGACCCTAATGT	247 bp

doi:10.1371/journal.pone.0144230.t001

mouse (NA931V) and anti-rabbit (NA934V) HRP-conjugated secondary antibodies were purchased from GE Healthcare Life Science and used at 1:3000.

Statistics

All values are expressed as mean \pm SEM and the significance level was set as $p < 0.05$. Differences between the two groups were evaluated for significance using the unpaired Student t-test or the Mann-Whitney test when data deviated from a normal distribution. When more than two simultaneous comparisons were made, a two-way ANOVA was employed to compare data (unloading and glycerol-injection factors). When a significant effect was indicated, a Fisher significant difference post hoc test was performed.

Results

Body mass, muscle mass, and fiber cross-sectional areas following 21 days of hindlimb unloading

Body mass was significantly changed after 21 days of HU (24.57g at day 0 and 22.81g at day 21, $p < 0.001$), whereas no difference was found in control conditions (26.13g at day 0 and 26.47g at day 21). SOL muscle mass, expressed in either absolute values or values normalized by body mass, decreased significantly after HU (-50.8% and -38% respectively, $p < 0.001$, [Fig 1a and 1b](#)) compared with CTL. EDL and TA muscle mass decreased significantly after HU, but only when expressed in absolute values (-15.1%, $p < 0.05$, and -11.5%, $p < 0.001$, respectively, [Fig 1a and 1b](#)). The mean CSA of SOL fibers was significantly reduced after HU compared with CTL (-50.6%, $p < 0.001$, [Fig 1c](#)). However, no significant differences were detected for the mean CSA of EDL and TA muscle fibers ([Fig 1c](#)). Thus, our results are in agreement with the literature, which has shown major atrophy in SOL, a postural muscle, following 21 days of HU [[6](#), [36](#)].

Hindlimb unloading disturbs regeneration in glycerol-injected tibialis anterior

Glycerol-injected tibialis anterior (TA_g) muscle mass, expressed in either absolute values or values normalized by body mass, decreased significantly after HU (-27.87% and -17.1% respectively, $p < 0.001$, [Fig 2a and 2b](#)) compared with TA_g-CTL. In parallel, the mean CSA of TA_g-HU fibers *versus* TA_g-CTL was significantly reduced (-25.1%, $p < 0.001$, [Fig 2c and 2d](#)). This suggests that hindlimb unloading affects skeletal muscle regeneration and thereby reduces myofiber size and mass recovery. We further examined the mRNA induction of key genes implicated in the muscle regeneration processes and myogenesis in TA and TA_g of the CTL

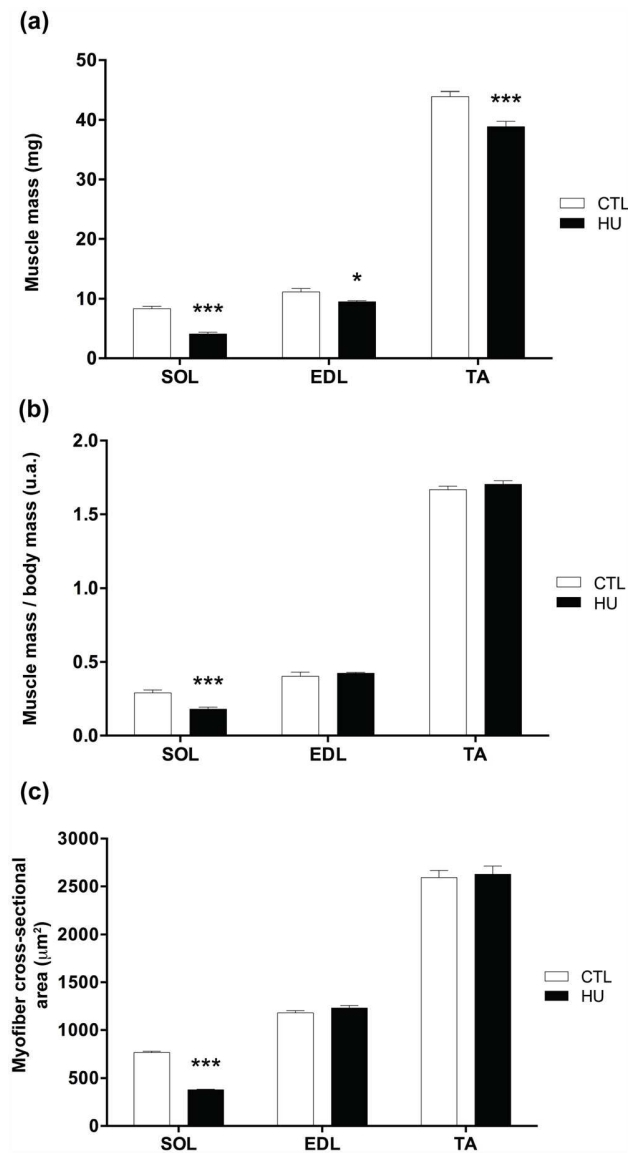


Fig 1. Effects of hindlimb unloading on muscle mass and fiber cross-sectional areas. Soleus (SOL), extensor digitorum longus (EDL), tibialis anterior (TA) skeletal muscle mass from control (CTL) and hindlimb unloading (HU) mice (a). SOL, EDL, and TA mass normalized by body mass from CTL and HU mice (b). Myofiber cross-sectional area (CSA) in μm^2 of SOL, EDL, and TA skeletal muscles from CTL and HU mice (c). * $p < 0.05$ vs control group, and *** $p < 0.001$ vs control group.

doi:10.1371/journal.pone.0144230.g001

and HU groups. mRNA induction of Pax7, a marker of quiescent and proliferative SCs in adult mice, decreased only in TAg-HU compared with TAg-CTL (-46.9%, $p < 0.05$, Fig 2e). Levels of MyoD and myogenin mRNA, two markers of activated and differentiation-engaged myoblasts, respectively, were reduced significantly in TA-HU versus TA-CTL (-43.7% and -43.5% respectively, $p < 0.05$, Fig 2f and 2g). A similar decrease in magnitude was also observed in TAg-HU versus TAg-CTL (-45.7%, $p < 0.01$ and -44.85%, $p < 0.05$, respectively, for MyoD and myogenin, Fig 2f and 2g). Taken together, these results based on mRNA analysis could indicate that hindlimb unloading alone did not alter the number of SCs but did decrease their mitotic activity.

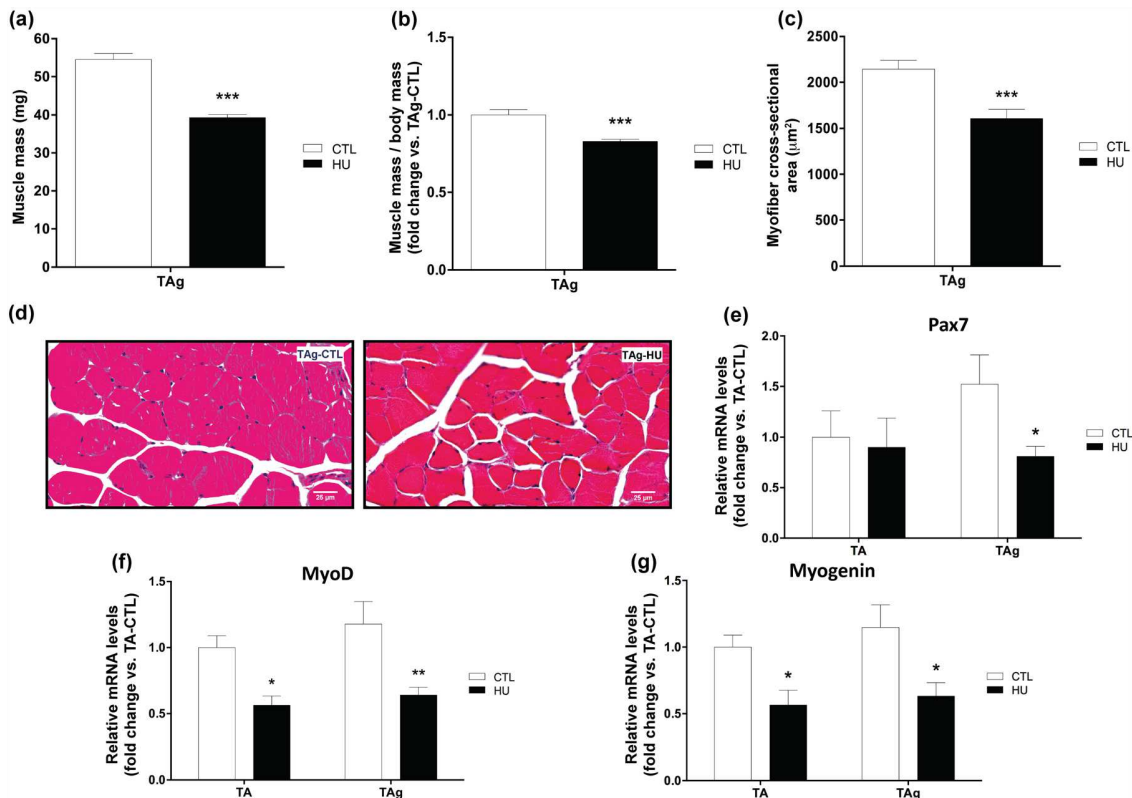


Fig 2. Effects of hindlimb unloading and glycerol injection on tibialis anterior muscle. Muscle mass (a), muscle mass/body mass (b) and cross-sectional area (CSA) (c) of glycerol-injected tibialis anterior (TA) from control (CTL) and hindlimb unloading (HU) mice. Representative histological transverse paraffin-embedded muscle sections, stained with hematoxylin-eosin-saffron from TA of each experimental group (CTL and HU) (d). Pax7 (e), MyoD (f) and myogenin (g) mRNA levels of TA and TA from CTL and HU mice. * $p < 0.05$ vs control group, ** $p < 0.01$ vs control group, *** $p < 0.001$ vs control group (unloading effect).

doi:10.1371/journal.pone.0144230.g002

However, when HU was associated with a regenerating context, we found a decrease in the SC pool and mitotic activity, which thus decreased the subsequent regrowth and myofiber size recovery.

Hypoactivity inhibits IMAT accumulation in regenerating TA muscle

It is well known that the glycerol model of muscle regeneration induces IMAT development during muscle regeneration. In our study, we confirmed the presence of IMAT in the TA injected with glycerol of normal-loaded animals (TA-CTL). The area occupied by IMAT 21 days after glycerol injection reached a mean 2.83% of the total muscle CSA, whereas TA-CTL showed no histological sign of IMAT (Fig 3a and 3b). Thus, as previously described in the study of Dani's group [21], it seems that the muscle microenvironment created by glycerol injection may favor adipogenesis from resident and/or recruited precursors, unlike what occurs in other regeneration models.

Conversely, unloading almost completely prevented IMAT development in TA: the area occupied by IMAT was almost nil (0.09%, $p < 0.05$) in TA-HU (Fig 3a and 3b). Moreover, CSA morphometric analysis of the adipocytes from IMAT showed a decrease in TA-HU compared with TA-CTL ($130\mu\text{m}^2$ and $510\mu\text{m}^2$, respectively, $p < 0.05$, Fig 3c and 3d).

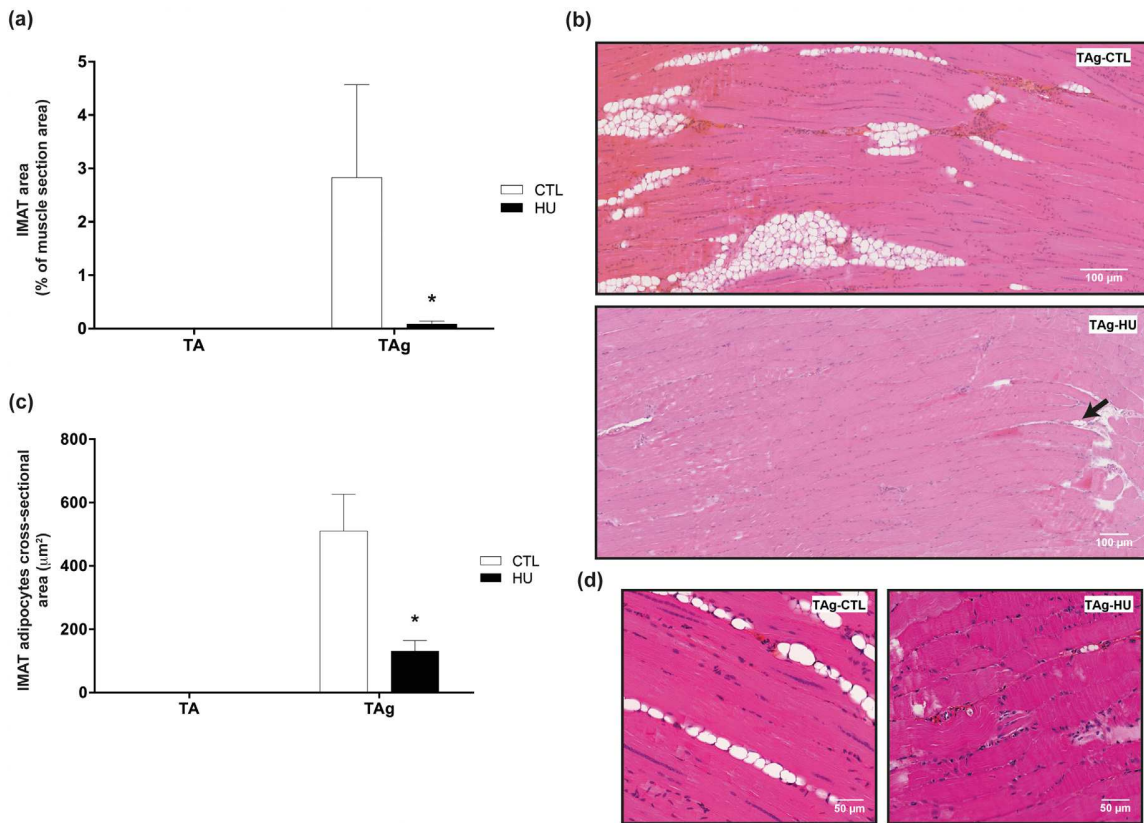


Fig 3. Effects of hindlimb unloading on IMAT development and accumulation. Intermuscular adipose tissue (IMAT) area in percentage of total muscle section area (a) and IMAT adipocyte cross-sectional area (CSA) in μm^2 (c) of saline-injected (TA) and glycerol-injected (TAg) tibialis anterior from control (CTL) and hindlimb unloading (HU) mice. * $p < 0.05$ vs control group. Representative histological longitudinal paraffin-embedded muscle sections, stained with hematoxylin-eosin-saffron from TAg of each experimental group (CTL and HU) (b, d).

doi:10.1371/journal.pone.0144230.g003

To further confirm the effects of hypoactivity on IMAT development, we quantified the expression of perilipin, fatty acid binding protein 4 (FABP4) and adiponectin, three markers of mature adipocytes. Concerning perilipin, the adipocyte lipid droplet protein marker, no signal was detected for the saline-injected TA, whereas its expression was clear in TAg, as expected (Fig 4a). In line with our previous results, perilipin expression in TAg was considerably decreased by HU (-87.7%, $p < 0.001$, Fig 4a). The expression level of FABP4, a cytoplasmic fatty acid chaperone, increased in TAg-CTL compared with TA-CTL (+246.7%, $p < 0.001$) and returned to baseline level in TAg-HU ($p < 0.01$, Fig 4b). The expression level of adiponectin, an adipokine, increased in TAg-CTL compared with TA-CTL (+228.2%, $p < 0.05$), whereas this difference was not observed between TAg-HU and TA-HU (Fig 4c). All together, these results were in agreement with our histological findings and confirmed that HU reduces IMAT accumulation in this model of muscle regeneration.

Hypoactivity decreases the adipogenesis processes in regenerating muscles

After determining that unloading was able to inhibit IMAT development in the glycerol regeneration model, we investigated the underlying mechanisms that led to the decrease in IMAT development in HU conditions. We first analyzed the mRNA induction and protein expression

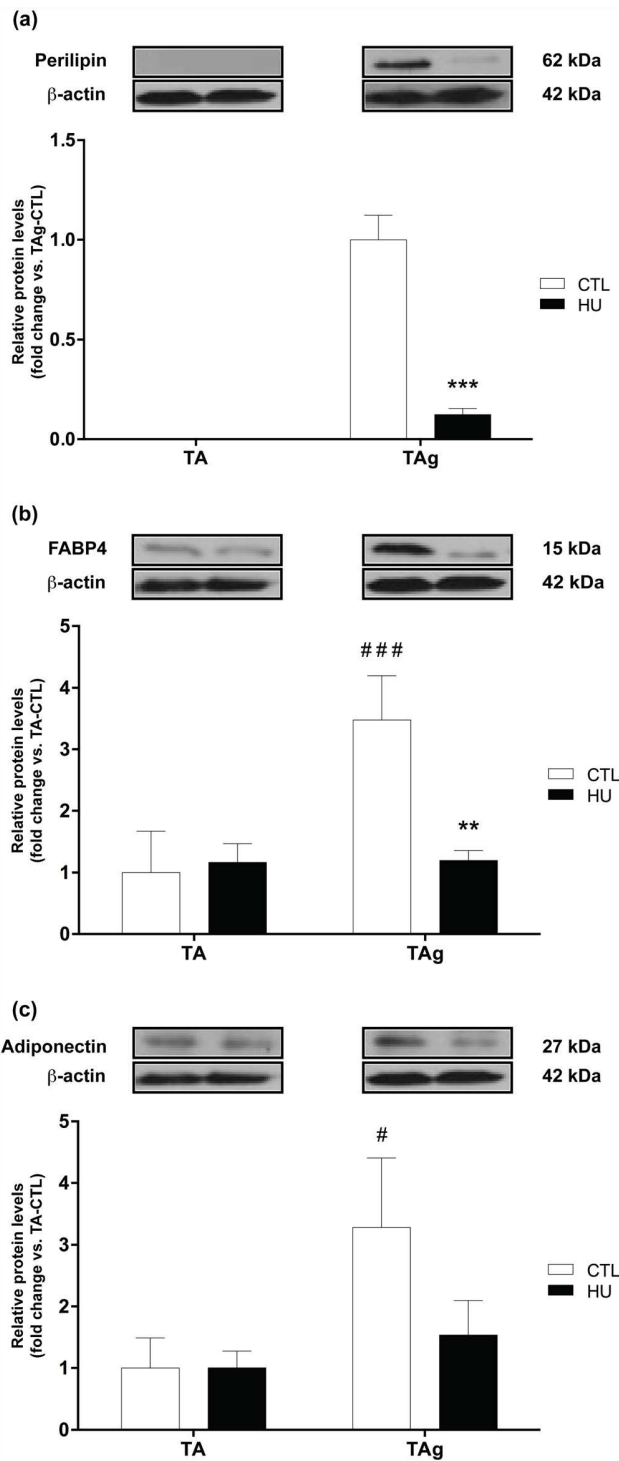


Fig 4. Protein expression levels of mature adipocyte markers. Perilipin (a), FABP4 (b) and adiponectin (c) protein content of saline-injected (TA) and glycerol-injected (TAg) tibialis anterior from control (CTL) and hindlimb unloading (HU) mice. ** $p < 0.01$ vs control group, *** $p < 0.001$ vs control group (unloading effect). # $p < 0.05$ vs TA-CTL, ### $p < 0.001$ vs TA-CTL (glycerol-injection effect).

doi:10.1371/journal.pone.0144230.g004

of PDGFR α , the cell surface marker of FAPs, and then we investigated the induction and/or expression of different markers involved in adipogenesis.

Firstly, we found no differences in PDGFR α protein expression or mRNA induction for saline-injected TA or TAg-CTL conditions (Fig 5a and 5b). The last confirming the return to basal values for PDGFR α marker 21 days after injury reported in the study of Lukjanenko et al. [22]. However, the protein content of PDGFR α was drastically lowered in TAg-HU *versus* TAg-CTL (-71.1%, $p < 0.05$, Fig 5b) and this result was confirmed by our immunohistochemical analysis (-77%, $p < 0.001$, Fig 5d), whereas the respective results for mRNA induction were not significantly different (Fig 5a). Antibody specificity was checked using mouse colon section as a positive control [37] (Fig 5c). As hypothesized, no change was observed in the induction of CCAAT/enhancer-binding protein β (C/EBP β) mRNA, a transcription factor implicated in an early step in adipogenesis (Fig 6a). However, mRNA induction of peroxisome proliferator-activated receptor- γ (PPAR γ) and CCAAT/enhancer binding protein α (C/EBP α), two transcriptional factors implicated in the later steps of adipogenesis, was lower in TAg-HU *versus* TAg-CTL (-51.6% and -53.2%, respectively, $p < 0.05$, Fig 6b and 6c). Furthermore, we observed an approximately 7-fold higher induction of C/EBP α mRNA in TAg-CTL compared with TA-CTL ($p < 0.01$, Fig 6c).

Discussion

The main objective of this study was to characterize the effects of prolonged hypoactivity on IMAT development in regenerating muscles. For that purpose, we used the well-described skeletal muscle regeneration model of glycerol injection, known to lead to IMAT formation. Our study shows for the first time that hypoactivity almost completely prevents IMAT accumulation.

Although IMAT may be a variable part of healthy human skeletal muscles, its increase and accumulation are synonymous with muscle dysfunction, deconditioning, and even perturbed regeneration [27, 30, 38]. The fat infiltration of muscle remains understudied and little is known about whether hypoactivity can lower or conversely enhance IMAT accumulation in pathological or regenerating skeletal muscle.

In our experiment, TAg muscles exhibited adiposity 21 days after glycerol injection and this result was strengthened by the increase in protein expression of several mature adipocyte markers: perilipin, FABP4 and adiponectin. Moreover, we analyzed the expression of the major transcriptional factors implicated in adipogenesis and found a significant induction of C/EBP α mRNA in TAg-CTL compared with TA-CTL. However, no difference in C/EBP β and PPAR γ mRNA induction was observed, although these two transcriptional factors are known to participate in adipogenesis in a phase earlier than C/EBP α , which appears to be up regulated at the end of the adipogenesis process [39]. This is in accordance with our present study: 21 days after glycerol injection adipogenesis was largely accomplished and the early adipogenic transcription factors had returned to basal values [22].

We further characterized the effects of prolonged hypoactivity on the confirmed IMAT accumulation. For this purpose, we used the well-characterized hindlimb suspension model and our study revealed for the first time an almost complete inhibition of adipogenesis in regenerating muscles induced by the glycerol model submitted to hypoactivity over the entire length of the regeneration period. Our histological examination of TAg-CTL and TAg-HU was performed over the entire depth of the muscle and we clearly observed the inhibition of adipogenesis in unloading conditions. This histological result was further supported by the quantification of perilipin, FABP4 and adiponectin expression, which considerably decreased following HU.

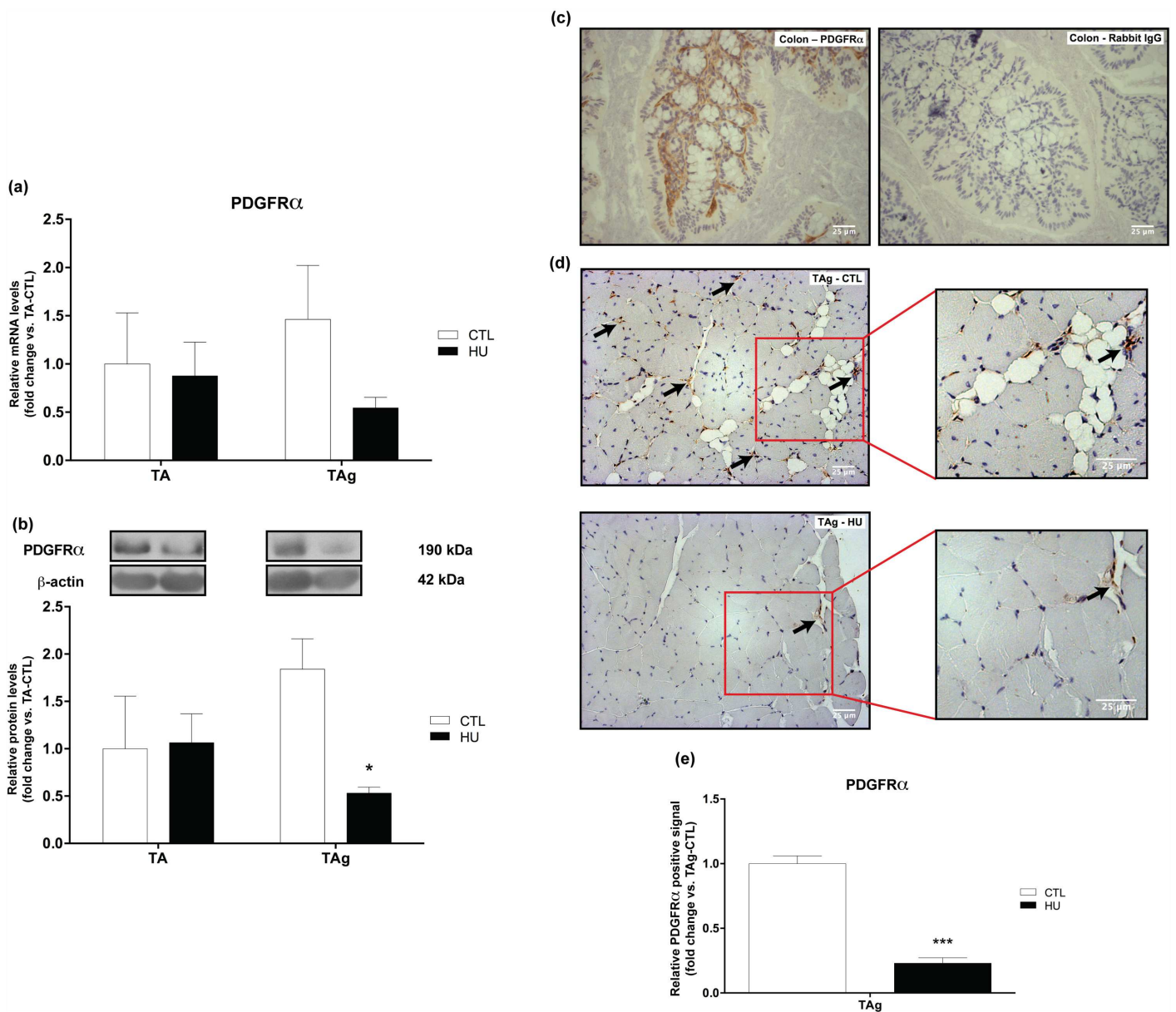


Fig 5. Expression levels of the FAP cell surface marker PDGFRα. PDGFRα mRNA (a) and protein (b) content of saline-injected (TA) and glycerol-injected (TAg) tibialis anterior from control (CTL) and hindlimb unloading (HU) mice. * $p < 0.05$ vs control group (unloading effect). Representative images (c, d) and quantification (e) of immunohistochemical analysis of PDGFRα-positive cells in mouse colon positive control (c) and glycerol-injected (TAg) tibialis anterior from control (CTL) and hindlimb unloading (HU) mice (d). *** $p < 0.001$ vs control group.

doi:10.1371/journal.pone.0144230.g005

Even though the precise mechanisms leading to IMAT formation in the glycerol model are still unclear, previous studies have described the respective roles of multipotent stem cells such as muscle-derived FAPs, pericytes, and side population cells giving rise to adipogenic precursors [26, 40–43]. Recently, a few groups have identified muscle mesenchymal progenitors with the immunophenotype CD31-CD45-SM/C-2.6-PDGFRα+, which contribute to fat cell formation in skeletal muscle [20, 43, 44]. PDGFRα has also been used very recently in human to isolate muscle mesenchymal progenitors, which are equivalent to the mouse FAPs [27, 45]. We

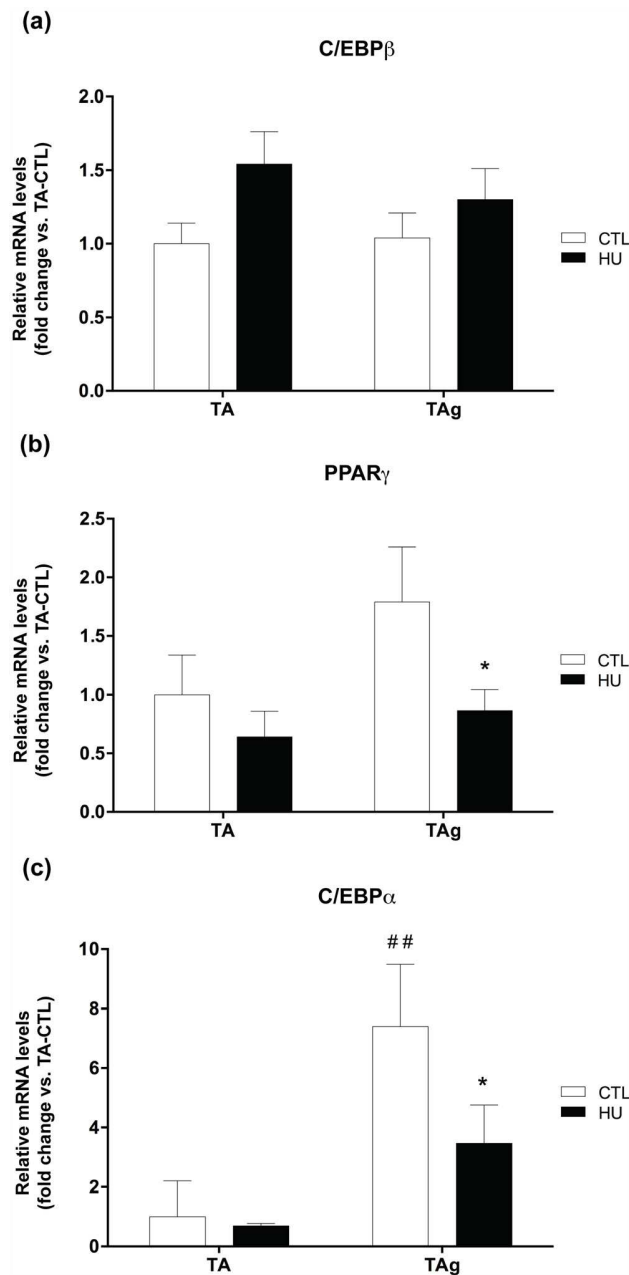


Fig 6. Changes in mRNA induction of adipogenesis markers. C/EBP β (a), PPAR γ (b) and C/EBP α (c) mRNA levels of saline-injected (TA) and glycerol-injected (TA_g) tibialis anterior from control (CTL) and hindlimb unloading (HU) mice. * $p < 0.05$ vs control group (unloading effect). ## $p < 0.01$ vs TA-CTL (glycerol-injection effect).

doi:10.1371/journal.pone.0144230.g006

used this FAP cell surface marker in the present study and found a marked decrease in its protein expression following HU. Our study thus indicates that hypoactivity is able to decrease PDGFR α -positive FAPs, which represent 98% of PDGFR α -positive cells in regenerating muscle [19]. Moreover, as reported by Uezumi et al. [20], only the PDGFR α -positive cells can differentiate into adipocytes in glycerol-injected muscles. We further observed reduced levels of

the later adipogenic transcription factors PPAR γ and C/EBP α . We did not detect any differences for C/EBP β , certainly due to its earlier implication in adipogenesis [39].

Interestingly, FAPs are also known to promote skeletal muscle regeneration after injury in healthy muscle [19, 25]. Heredia et al. [25] showed that FAP proliferation and macrophage-like activity are essential to the regeneration process. In this context, decreased FAP proliferation could result in a decreased number of adipocytes, as well as impair the regenerative kinetics [25]. Skeletal muscle regenerative capacity is mainly dependent on the activation of SCs, which are finely controlled by the myogenic regulatory factors. Quiescent and proliferative SCs express the paired box transcription factor (Pax7) and its inactivation leads to a severe depletion of these muscle myogenic stem cells [46]. In regenerating muscle, the proliferating process is triggered by the expression of myoblast determination protein 1 (MyoD) and myogenic factor 5 (Myf5) [47, 48]. Once differentiation is initiated, myogenin appears to be implicated first, and then muscle-specific regulatory factor 4 (Mrf4) is activated during the maturation phase [49, 50]. In our study, we first described a decrease in MyoD and myogenin mRNA induction in TA-HU concomitant with no significant effect on Pax7. These results are in accordance with studies demonstrating that HU does not necessarily alter the number of SCs in fast-twitch skeletal muscle, probably indicating no SC loss by apoptosis [51], but that it does alter SC mitotic activity [7, 9, 51, 52]. We then observed a decrease in Pax7, MyoD, and myogenin mRNA induction, parallel to the decrease in muscle mass and CSA in TAg-HU. Taken together, these results confirm that reducing mechanical constraints throughout muscle regeneration disturbs SC-mediated regeneration and thus delays myofiber size recovery, as indicated in the study of Matsuba et al. [53]. Nevertheless, the study of Mozdziaik et al. [8] showed that the hindlimb unloading condition does not decrease but could even enhance the mitotic activity of SCs and probably that of non-muscle cells in the earlier stages of regeneration. However, once new myofibers are formed, their growth capacity is altered. Our results suggest that HU may alter regrowth after regeneration, but we cannot exclude the hypothesis that HU may enhance early regeneration processes, thereby inhibiting IMAT occurrence and further disturbing muscle regrowth. Clearly, additional studies are warranted to elucidate the early events related to mesenchymal non-muscle cells and their implication in both the regeneration process and adipogenesis during unloading conditions.

Currently, we do not know the exact underlying mechanisms leading to the inhibition of muscle adipogenesis in regenerating muscles under unloading conditions. As highlighted in the literature, hindlimb unloading appears to be a proinflammatory situation with macrophage infiltration [54–58]. Interestingly, recent studies have reported the critical role of inflammation and the immune system in muscle regeneration [59–62], and it appears that both macrophage shift and activity are essentials in this process. In addition, the study of Lukjanenko et al. [22] revealed that the glycerol injury model exhibits a disrupted inflammatory response compared with the cardiotoxin-induced injury model. Further studies are needed to elucidate the underlying mechanisms of unloading-induced inhibition of skeletal muscle IMAT development and accumulation and especially the effects of an inflammatory response on mesenchymal stem cells.

In conclusion, our study reports for the first time an almost complete inhibition of IMAT development in regenerating muscles under hypoactivity conditions. We found a decreased response of mesenchymal-derived precursor FAPs (PDGFR α^+), which could explain the decrease in IMAT development in the present model. Hypoactivity seems to locally create a favorable environment leading to a decrease in PDGFR α positive cells.

These observations shed new light on the mechanisms that regulate IMAT development in skeletal muscle and highlight the importance of taking into account the level of mechanical constraint imposed on skeletal muscle during regeneration processes. Our findings point in the

same direction as those reported by Jarvinen and Lehto [31] concerning immobilization, which was found to mediate a decrease in fibrotic area after gastrocnemius injury in rats.

In the one hand, our results suggest that a rest period with reduced mechanical constraints might be needed immediately after injury to prevent IMAT accumulation. However, our study also shows that the regrowth of skeletal muscle fibers is impaired under hypoactivity, which highlights the importance of applying mechanical constraints as soon as possible after the rest period for the recovery of fiber size. Our present and future studies should contribute to a fuller understanding of IMAT accumulation and the establishment of rehabilitation guidelines for human muscle injuries.

Supporting Information

S1 Checklist. ARRIVE Checklist.
(PDF)

Acknowledgments

We particularly thank Laurence Vico for providing the materials used in the tail-suspended experiments and Catherine Stott for the English correction of the manuscript. The authors greatly acknowledge the “Réseau d’Histologie Expérimentale de Montpellier” (RHEM) platform for histology core facilities and paraffin processing of the tibialis anterior muscles, and especially Nelly Pirot, Charlène Berthet, and Yohan Noël. We also thank the animal staff from our METAMUS platform facility, which belongs to the “Montpellier animal facilities network” (RAM), as well as the “Montpellier RIO Imaging” (MRI) platform for the use of the Nanozoomer.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: AFP RD AC TB GP CD CAD. Performed the experiments: AFP RD GP TB. Analyzed the data: AFP RD GP AC AB. Contributed reagents/materials/analysis tools: AFP RD AC GP EJ CBG. Wrote the paper: AFP GP AC. Manuscript revision and feedback: AFP AC GP CD CAD RC AB.

References

1. Huard J, Li Y, Fu FH. Muscle injuries and repair: current trends in research. *J Bone Joint Surg Am.* 2002; 84-A(5):822–832. PMID: [12004029](#)
2. Mauro A. Satellite cell of skeletal muscle fibers. *The Journal of biophysical and biochemical cytology.* 1961; 9:493–495. PMID: [13768451](#)
3. Zammit PS, Heslop L, Hudon V, Rosenblatt JD, Tajbakhsh S, Buckingham ME, et al. Kinetics of myoblast proliferation show that resident satellite cells are competent to fully regenerate skeletal muscle fibers. *Experimental cell research.* 2002; 281(1):39–49. PMID: [12441128](#)
4. Sambasivan R, Yao R, Kissenpennig A, Van Wittenberghe L, Paldi A, Gayraud-Morel B, et al. Pax7-expressing satellite cells are indispensable for adult skeletal muscle regeneration. *Development.* 2011; 138(17):3647–3656. doi: [10.1242/dev.067587](#) PMID: [21828093](#)
5. Relaix F, Zammit PS. Satellite cells are essential for skeletal muscle regeneration: the cell on the edge returns centre stage. *Development.* 2012; 139(16):2845–2856. doi: [10.1242/dev.069088](#) PMID: [22833472](#)
6. Baldwin KM, Haddad F, Pandorf CE, Roy RR, Edgerton VR. Alterations in muscle mass and contractile phenotype in response to unloading models: role of transcriptional/pretranslational mechanisms. *Frontiers in physiology.* 2013; 4:284. doi: [10.3389/fphys.2013.00284](#) PMID: [24130531](#)
7. Darr KC, Schultz E. Hindlimb suspension suppresses muscle growth and satellite cell proliferation. *J Appl Physiol* (1985). 1989; 67(5):1827–1834.

8. Mozdziak PE, Truong Q, Macius A, Schultz E. Hindlimb suspension reduces muscle regeneration. *European journal of applied physiology and occupational physiology*. 1998; 78(2):136–140. doi: [10.1007/s004210050398](https://doi.org/10.1007/s004210050398) PMID: [9694312](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9694312/)
9. Wang XD, Kawano F, Matsuoka Y, Fukunaga K, Terada M, Sudoh M, et al. Mechanical load-dependent regulation of satellite cell and fiber size in rat soleus muscle. *American journal of physiology Cell physiology*. 2006; 290(4):C981–989. doi: [10.1152/ajpcell.00298.2005](https://doi.org/10.1152/ajpcell.00298.2005) PMID: [16291821](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16291821/)
10. Vettor R, Milan G, Franzin C, Sanna M, De Coppi P, Rizzuto R, et al. The origin of intermuscular adipose tissue and its pathophysiological implications. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism*. 2009; 297(5):E987–998. doi: [10.1152/ajpendo.00229.2009](https://doi.org/10.1152/ajpendo.00229.2009) PMID: [19738037](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19738037/)
11. Summan M, Warren GL, Mercer RR, Chapman R, Hulderman T, Van Rooijen N, et al. Macrophages and skeletal muscle regeneration: a clodronate-containing liposome depletion study. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology*. 2006; 290(6):R1488–1495. doi: [10.1152/ajpregu.00465.2005](https://doi.org/10.1152/ajpregu.00465.2005) PMID: [16424086](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16424086/)
12. Contreras-Shannon V, Ochoa O, Reyes-Reyna SM, Sun D, Michalek JE, Kuziel WA, et al. Fat accumulation with altered inflammation and regeneration in skeletal muscle of CCR2^{-/-} mice following ischemic injury. *American journal of physiology Cell physiology*. 2007; 292(2):C953–967. doi: [10.1152/ajpcell.00154.2006](https://doi.org/10.1152/ajpcell.00154.2006) PMID: [17020936](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17020936/)
13. Shireman PK, Contreras-Shannon V, Ochoa O, Karia BP, Michalek JE, McManus LM. MCP-1 deficiency causes altered inflammation with impaired skeletal muscle regeneration. *Journal of leukocyte biology*. 2007; 81(3):775–785. doi: [10.1189/jlb.0506356](https://doi.org/10.1189/jlb.0506356) PMID: [17135576](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17135576/)
14. Arnold L, Henry A, Poron F, Baba-Amer Y, van Rooijen N, Plonquet A, et al. Inflammatory monocytes recruited after skeletal muscle injury switch into antiinflammatory macrophages to support myogenesis. *The Journal of experimental medicine*. 2007; 204(5):1057–1069. doi: [10.1084/jem.20070075](https://doi.org/10.1084/jem.20070075) PMID: [17485518](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17485518/)
15. Segawa M, Fukada S, Yamamoto Y, Yahagi H, Kanematsu M, Sato M, et al. Suppression of macrophage functions impairs skeletal muscle regeneration with severe fibrosis. *Experimental cell research*. 2008; 314(17):3232–3244. doi: [10.1016/j.yexcr.2008.08.008](https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2008.08.008) PMID: [18775697](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18775697/)
16. Kawai H, Nishino H, Kusaka K, Naruo T, Tamaki Y, Iwasa M. Experimental glycerol myopathy: a histological study. *Acta neuropathologica*. 1990; 80(2):192–197. PMID: [2389683](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2389683/)
17. Arsic N, Zacchigna S, Zentilin L, Ramirez-Correa G, Pattarini L, Salvi A, et al. Vascular endothelial growth factor stimulates skeletal muscle regeneration in vivo. *Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy*. 2004; 10(5):844–854. doi: [10.1016/j.ymthe.2004.08.007](https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2004.08.007)
18. Abraham ST, Shaw C. Increased expression of deltaCaMKII isoforms in skeletal muscle regeneration: Implications in dystrophic muscle disease. *J Cell Biochem*. 2006; 97(3):621–632. doi: [10.1002/jcb.20669](https://doi.org/10.1002/jcb.20669) PMID: [16215994](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16215994/)
19. Joe AW, Yi L, Natarajan A, Le Grand F, So L, Wang J, et al. Muscle injury activates resident fibro/adipogenic progenitors that facilitate myogenesis. *Nature cell biology*. 2010; 12(2):153–163. doi: [10.1038/ncb2015](https://doi.org/10.1038/ncb2015) PMID: [20081841](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20081841/)
20. Uezumi A, Fukada S, Yamamoto N, Takeda S, Tsuchida K. Mesenchymal progenitors distinct from satellite cells contribute to ectopic fat cell formation in skeletal muscle. *Nature cell biology*. 2010; 12(2):143–152. doi: [10.1038/ncb2014](https://doi.org/10.1038/ncb2014) PMID: [20081842](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20081842/)
21. Pisani DF, Bottema CD, Butori C, Dani C, Dechesne CA. Mouse model of skeletal muscle adiposity: a glycerol treatment approach. *Biochemical and biophysical research communications*. 2010; 396(3):767–773. doi: [10.1016/j.bbrc.2010.05.021](https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.05.021) PMID: [20457129](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20457129/)
22. Lukjanenko L, Brachat S, Pierrel E, Lach-Trifileff E, Feige JN. Genomic profiling reveals that transient adipogenic activation is a hallmark of mouse models of skeletal muscle regeneration. *PloS one*. 2013; 8(8):e71084. doi: [10.1371/journal.pone.0071084](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0071084) PMID: [23976982](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23976982/)
23. Motohashi N, Uezumi A, Yada E, Fukada S, Fukushima K, Imaizumi K, et al. Muscle CD31⁻ CD45⁻ side population cells promote muscle regeneration by stimulating proliferation and migration of myoblasts. *The American journal of pathology*. 2008; 173(3):781–791. doi: [10.2353/ajpath.2008.070902](https://doi.org/10.2353/ajpath.2008.070902) PMID: [18669618](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18669618/)
24. Takegahara Y, Yamanouchi K, Nakamura K, Nakano S, Nishihara M. Myotube formation is affected by adipogenic lineage cells in a cell-to-cell contact-independent manner. *Experimental cell research*. 2014; 324(1):105–114. doi: [10.1016/j.yexcr.2014.03.021](https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2014.03.021) PMID: [24720912](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24720912/)
25. Heredia JE, Mukundan L, Chen FM, Mueller AA, Deo RC, Locksley RM, et al. Type 2 innate signals stimulate fibro/adipogenic progenitors to facilitate muscle regeneration. *Cell*. 2013; 153(2):376–388. doi: [10.1016/j.cell.2013.02.053](https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.02.053) PMID: [23582327](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23582327/)
26. Uezumi A, Ito T, Morikawa D, Shimizu N, Yoneda T, Segawa M, et al. Fibrosis and adipogenesis originate from a common mesenchymal progenitor in skeletal muscle. *Journal of cell science*. 2011; 124(Pt 21):3654–3664. doi: [10.1242/jcs.086629](https://doi.org/10.1242/jcs.086629) PMID: [22045730](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22045730/)

27. Uezumi A, Fukada S, Yamamoto N, Ikemoto-Uezumi M, Nakatani M, Morita M, et al. Identification and characterization of PDGFR α (+) mesenchymal progenitors in human skeletal muscle. *Cell death & disease*. 2014; 5:e1186. doi: [10.1038/cddis.2014.161](https://doi.org/10.1038/cddis.2014.161)
28. Blau HM, Webster C, Pavlath GK. Defective myoblasts identified in Duchenne muscular dystrophy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1983; 80(15):4856–4860. PMID: [6576361](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6576361/)
29. Heslop L, Morgan JE, Partridge TA. Evidence for a myogenic stem cell that is exhausted in dystrophic muscle. *Journal of cell science*. 2000; 113:2299–2308. PMID: [10825301](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10825301/)
30. Sciorati C, Clementi E, Manfredi AA, Rovere-Querini P. Fat deposition and accumulation in the damaged and inflamed skeletal muscle: cellular and molecular players. *Cellular and molecular life sciences: CMLS*. 2015. doi: [10.1007/s00018-015-1857-7](https://doi.org/10.1007/s00018-015-1857-7)
31. Jarvinen MJ, Lehto MU. The effects of early mobilisation and immobilisation on the healing process following muscle injuries. *Sports Med*. 1993; 15(2):78–89. PMID: [8446826](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8446826/)
32. Amblard D, Lafage-Proust MH, Laib A, Thomas T, Rueggsegger P, Alexandre C, et al. Tail suspension induces bone loss in skeletally mature mice in the C57BL/6J strain but not in the C3H/HeJ strain. *Journal of bone and mineral research: the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 2003; 18(3):561–569. doi: [10.1359/jbmr.2003.18.3.561](https://doi.org/10.1359/jbmr.2003.18.3.561)
33. Malaval L, Wade-Gueye NM, Boudiffa M, Fei J, Zinggibl R, Chen F, et al. Bone sialoprotein plays a functional role in bone formation and osteoclastogenesis. *The Journal of experimental medicine*. 2008; 205(5):1145–1153. doi: [10.1084/jem.20071294](https://doi.org/10.1084/jem.20071294) PMID: [18458111](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18458111/)
34. Pirot N, Delpech H, Deleuze V, Dohet C, Courtade-Saidi M, Basset-Leobon C, et al. Lung endothelial barrier disruption in Ly11-deficient mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2014; 306(8):L775–785. doi: [10.1152/ajplung.00200.2013](https://doi.org/10.1152/ajplung.00200.2013) PMID: [24532287](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24532287/)
35. Pagano AF, Py G, Bernardi H, Candau RB, Sanchez AM. Autophagy and Protein Turnover Signaling in Slow-Twitch Muscle during Exercise. *Medicine and science in sports and exercise*. 2014. doi: [10.1249/MSS.0000000000000237](https://doi.org/10.1249/MSS.0000000000000237)
36. Hanson AM, Harrison BC, Young MH, Stodieck LS, Ferguson VL. Longitudinal characterization of functional, morphologic, and biochemical adaptations in mouse skeletal muscle with hindlimb suspension. *Muscle & nerve*. 2013; 48(3):393–402. doi: [10.1002/mus.23753](https://doi.org/10.1002/mus.23753)
37. Kurahashi M, Nakano Y, Peri LE, Townsend JB, Ward SM, Sanders KM. A novel population of subepithelial platelet-derived growth factor receptor alpha-positive cells in the mouse and human colon. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2013; 304(9):G823–834. doi: [10.1152/ajpgi.00001.2013](https://doi.org/10.1152/ajpgi.00001.2013) PMID: [23429582](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23429582/)
38. Marcus RL, Addison O, Kidde JP, Dibble LE, Lastayo PC. Skeletal muscle fat infiltration: impact of age, inactivity, and exercise. *The journal of nutrition, health & aging*. 2010; 14(5):362–366.
39. White UA, Stephens JM. Transcriptional factors that promote formation of white adipose tissue. *Molecular and cellular endocrinology*. 2010; 318(1–2):10–14. doi: [10.1016/j.mce.2009.08.023](https://doi.org/10.1016/j.mce.2009.08.023) PMID: [19733624](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19733624/)
40. Uezumi A, Ojima K, Fukada S, Ikemoto M, Masuda S, Miyagoe-Suzuki Y, et al. Functional heterogeneity of side population cells in skeletal muscle. *Biochemical and biophysical research communications*. 2006; 341(3):864–873. doi: [10.1016/j.bbrc.2006.01.037](https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.01.037) PMID: [16455057](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16455057/)
41. Birbrair A, Zhang T, Wang ZM, Messi ML, Enikolopov GN, Mintz A, et al. Role of pericytes in skeletal muscle regeneration and fat accumulation. *Stem cells and development*. 2013; 22(16):2298–2314. doi: [10.1089/scd.2012.0647](https://doi.org/10.1089/scd.2012.0647) PMID: [23517218](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23517218/)
42. Boppart MD, De Lisio M, Zou K, Huntsman HD. Defining a role for non-satellite stem cells in the regulation of muscle repair following exercise. *Frontiers in physiology*. 2013; 4:310. doi: [10.3389/fphys.2013.00310](https://doi.org/10.3389/fphys.2013.00310) PMID: [24204344](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24204344/)
43. Judson RN, Zhang RH, Rossi FM. Tissue-resident mesenchymal stem/progenitor cells in skeletal muscle: collaborators or saboteurs? *The FEBS journal*. 2013; 280(17):4100–4108. doi: [10.1111/febs.12370](https://doi.org/10.1111/febs.12370) PMID: [23763717](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23763717/)
44. Arrighi N, Moratal C, Clement N, Giorgetti-Peraldi S, Peraldi P, Loubat A, et al. Characterization of adipocytes derived from fibro/adipogenic progenitors resident in human skeletal muscle. *Cell death & disease*. 2015; 6:e1733. doi: [10.1038/cddis.2015.79](https://doi.org/10.1038/cddis.2015.79)
45. Uezumi A, Ikemoto-Uezumi M, Tsuchida K. Roles of nonmyogenic mesenchymal progenitors in pathogenesis and regeneration of skeletal muscle. *Frontiers in physiology*. 2014; 5:68. doi: [10.3389/fphys.2014.00068](https://doi.org/10.3389/fphys.2014.00068) PMID: [24605102](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24605102/)
46. Seale P, Sabourin LA, Girgis-Gabardo A, Mansouri A, Gruss P, Rudnicki MA. Pax7 is required for the specification of myogenic satellite cells. *Cell*. 2000; 102(6):777–786. PMID: [11030621](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11030621/)

47. Megeney LA, Kablar B, Garrett K, Anderson JE, Rudnicki MA. MyoD is required for myogenic stem cell function in adult skeletal muscle. *Genes & development*. 1996; 10(10):1173–1183.
48. Ustanina S, Carvajal J, Rigby P, Braun T. The myogenic factor Myf5 supports efficient skeletal muscle regeneration by enabling transient myoblast amplification. *Stem Cells*. 2007; 25(8):2006–2016. doi: [10.1634/stemcells.2006-0736](https://doi.org/10.1634/stemcells.2006-0736) PMID: [17495111](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17495111/)
49. Hasty P, Bradley A, Morris JH, Edmondson DG, Venuti JM, Olson EN, et al. Muscle deficiency and neonatal death in mice with a targeted mutation in the myogenin gene. *Nature*. 1993; 364(6437):501–506. doi: [10.1038/364501a0](https://doi.org/10.1038/364501a0) PMID: [8393145](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8393145/)
50. Zhang W, Behringer RR, Olson EN. Inactivation of the myogenic bHLH gene MRF4 results in up-regulation of myogenin and rib anomalies. *Genes & development*. 1995; 9(11):1388–1399.
51. Zhang BT, Yeung SS, Liu Y, Wang HH, Wan YM, Ling SK, et al. The effects of low frequency electrical stimulation on satellite cell activity in rat skeletal muscle during hindlimb suspension. *BMC Cell Biol*. 2010; 11:87. doi: [10.1186/1471-2121-11-87](https://doi.org/10.1186/1471-2121-11-87) PMID: [21087483](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21087483/)
52. Schultz E, Darr KC, Macius A. Acute effects of hindlimb unweighting on satellite cells of growing skeletal muscle. *J Appl Physiol* (1985). 1994; 76(1):266–270.
53. Matsuba Y, Goto K, Morioka S, Naito T, Akema T, Hashimoto N, et al. Gravitational unloading inhibits the regenerative potential of atrophied soleus muscle in mice. *Acta Physiol (Oxf)*. 2009; 196(3):329–339. doi: [10.1111/j.1748-1716.2008.01943.x](https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.2008.01943.x)
54. Nguyen HX, Tidball JG. Expression of a muscle-specific, nitric oxide synthase transgene prevents muscle membrane injury and reduces muscle inflammation during modified muscle use in mice. *The Journal of physiology*. 2003; 550(Pt 2):347–356. doi: [10.1113/jphysiol.2003.040907](https://doi.org/10.1113/jphysiol.2003.040907) PMID: [12766242](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12766242/)
55. Hirose T, Nakazato K, Song H, Ishii N. TGF-beta1 and TNF-alpha are involved in the transcription of type I collagen alpha2 gene in soleus muscle atrophied by mechanical unloading. *J Appl Physiol* (1985). 2008; 104(1):170–177. doi: [10.1152/jappphysiol.00463.2006](https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00463.2006)
56. Andrianjafiniony T, Dupre-Aucouturier S, Letexier D, Couchoux H, Desplanches D. Oxidative stress, apoptosis, and proteolysis in skeletal muscle repair after unloading. *American journal of physiology Cell physiology*. 2010; 299(2):C307–315. doi: [10.1152/ajpcell.00069.2010](https://doi.org/10.1152/ajpcell.00069.2010) PMID: [20505039](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20505039/)
57. Kohno S, Yamashita Y, Abe T, Hirasaka K, Oarada M, Ohno A, et al. Unloading stress disturbs muscle regeneration through perturbed recruitment and function of macrophages. *J Appl Physiol* (1985). 2012; 112(10):1773–1782. doi: [10.1152/jappphysiol.00103.2012](https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00103.2012)
58. Gratas-Delamarche A, Derbre F, Vincent S, Cillard J. Physical inactivity, insulin resistance, and the oxidative-inflammatory loop. *Free radical research*. 2014; 48(1):93–108. doi: [10.3109/10715762.2013.847528](https://doi.org/10.3109/10715762.2013.847528) PMID: [24060092](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24060092/)
59. Aurora AB, Olson EN. Immune Modulation of Stem Cells and Regeneration. *Cell stem cell*. 2014; 15(1):14–25. doi: [10.1016/j.stem.2014.06.009](https://doi.org/10.1016/j.stem.2014.06.009) PMID: [24996166](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24996166/)
60. Madaro L, Bouche M. From Innate to Adaptive Immune Response in Muscular Dystrophies and Skeletal Muscle Regeneration: The Role of Lymphocytes. *BioMed research international*. 2014; 2014:438675. doi: [10.1155/2014/438675](https://doi.org/10.1155/2014/438675) PMID: [25028653](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25028653/)
61. Maffioletti SM, Noviello M, English K, Tedesco FS. Stem Cell Transplantation for Muscular Dystrophy: The Challenge of Immune Response. *BioMed research international*. 2014; 2014:964010. doi: [10.1155/2014/964010](https://doi.org/10.1155/2014/964010) PMID: [25054157](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25054157/)
62. Lemos DR, Babaeijandaghi F, Low M, Chang CK, Lee ST, Fiore D, et al. Nilotinib reduces muscle fibrosis in chronic muscle injury by promoting TNF-mediated apoptosis of fibro/adipogenic progenitors. *Nature medicine*. 2015. doi: [10.1038/nm.3869](https://doi.org/10.1038/nm.3869)

ARTICLE 2

Short-term disuse promotes fatty acid infiltration into skeletal muscle

Allan F. Pagano, Thomas Brioché, Coralie Arc-Chagnaud, Rémi Demangel, Angèle Chopard, Guillaume Py. (accepté le 02 Octobre 2017 dans *The Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle* ; IF = 9,70).

Short-term disuse promotes fatty acid infiltration into skeletal muscle

Allan F. Pagano¹, Thomas Brioché¹, Coralie Arc-Chagnaud^{1,2}, Rémi Demangel¹, Angèle Chopard^{1†} & Guillaume Py^{1*†}

¹INRA, UMR866 Dynamique Musculaire et Métabolisme, Université de Montpellier, F-34060, Montpellier, France; ²Freshage Research Group - Dept. Physiology, University of Valencia, CIBERFES, INCLIVA, Valencia, Spain

Abstract

Background Many physiological and/or pathological conditions lead to muscle deconditioning, a well-described phenomenon characterized by a loss of strength and muscle power mainly due to the loss of muscle mass. Fatty infiltrations, or intermuscular adipose tissue (IMAT), are currently well-recognized components of muscle deconditioning. Despite the fact that IMAT is present in healthy human skeletal muscle, its increase and accumulation are linked to muscle dysfunction. Although IMAT development has been largely attributable to inactivity, the precise mechanisms of its establishment are still poorly understood. Because the sedentary lifestyle that accompanies age-related sarcopenia may favour IMAT development, deciphering the early processes of muscle disuse is of great importance before implementing strategies to limit IMAT deposition.

Methods In our study, we took advantage of the dry immersion (DI) model of severe muscle inactivity to induce rapid muscle deconditioning during a short period. During the DI, healthy adult men ($n = 12$; age: 32 ± 5) remained strictly immersed, in a supine position, in a controlled thermo-neutral water bath. Skeletal muscle biopsies were obtained from the vastus lateralis before and after 3 days of DI.

Results We showed that DI for only 3 days was able to decrease myofiber cross-sectional areas (-10.6%). Moreover, protein expression levels of two key markers commonly used to assess IMAT, perilipin, and fatty acid binding protein 4, were upregulated. We also observed an increase in the C/EBP α and PPAR γ protein expression levels, indicating an increase in late adipogenic processes leading to IMAT development. While many stem cells in the muscle environment can adopt the capacity to differentiate into adipocytes, fibro-adipogenic progenitors (FAPs) represent the population that appears to play a major role in IMAT development. In our study, we showed an increase in the protein expression of PDGFR α , the specific cell surface marker of FAPs, in response to 3 days of DI. It is well recognized that an unfavourable muscle environment drives FAPs to ectopic adiposity and/or fibrosis.

Conclusions This study is the first to emphasize that during a short period of severe inactivity, muscle deconditioning is associated with IMAT development. Our study also reveals that FAPs could be the main resident muscle stem cell population implicated in ectopic adiposity development in human skeletal muscle.

Keywords Skeletal muscle disuse; Microgravity; Dry immersion; Fat infiltration; Adipogenesis; FAPs

Received: 28 June 2017; Revised: 10 September 2017; Accepted: 2 October 2017

*Correspondence to: Guillaume Py, INRA UMR 866, 2 place Pierre Viala, 34060 Montpellier, France. Tel: 04.99.61.22.22; Fax: 04.67.54.56.94;

Email: guillaume.py@umontpellier.fr

†These authors contributed equally to this work

Introduction

The skeletal muscle is the most abundant tissue in the human body, representing approximately 40% of the body weight and accounting for approximately 30% of the basal energy expenditure.¹ This tissue is constantly adapting due to many

intrinsic and environmental stresses, highlighting its high degree of plasticity. An increase in chronic stimulation through exercise and/or nutrition can cause a positive protein balance that can further lead to muscle hypertrophy.^{2–4} Conversely, a chronic decrease in mechanical constraints can lead to muscle deconditioning and atrophy.^{5–11} Skeletal muscle

deconditioning can be defined as primary deconditioning, in case of direct consequences of unfavourable environmental conditions, such as chronic disuse, immobilization, a microgravity environment, sedentary lifestyle, and ageing (sarcopenia), or as secondary deconditioning, in case of indirect consequences of pathological changes like cancer (cachexia), diabetes, or chronic obstructive pulmonary disease.¹²

Muscle deconditioning is a well-described phenomenon characterized by a loss of strength and muscle power mainly due to the loss of muscle mass.^{13,14} However, there is now a growing body of evidence indicating that the loss of strength and power mostly exceeds the loss of muscle mass observed after inactivity or in advancing age,^{12,15–18} thereby suggesting that other factors are involved. Among these factors, accumulation of fatty infiltrations, or intermuscular adipose tissue (IMAT), may play a critical role. These fat cells, located under the epimysium (between bundles of muscle fibres) and under the perimysium (between muscle fibres), represent real adipocyte clusters, i.e. ectopic fat depots that are localized outside muscle cells, and should not be confused with intramyocellular triglyceride accumulation.^{19,20} Although IMAT is naturally present in healthy human skeletal muscle, its increase and accumulation are linked to muscle dysfunction, deconditioning, and even disrupted regeneration processes.^{10,12,19,21–23} Accumulation of these fatty infiltrations has been observed in many conditions closely linked to muscle deconditioning: inactivity,^{9,24,25} denervation,^{26,27} diabetes,^{28–30} tenotomy^{31,32} or even sarcopenia.^{12,21,33} In the specific context of sarcopenia, numerous studies have shown that IMAT infiltration into the mid-thigh muscle remains an independent risk factor of mobility limitations,^{34–36} and IMAT level was also found to be a good predictor of clinical fracture in older adults.³⁷

While many stem cells within the muscle environment could potentially differentiate into adipocytes, fibro-adipogenic progenitors (FAPs) currently represent the main stem cell population playing a major role in IMAT development. A study by Uezumi *et al.*³⁸ clearly showed that only progenitor cells expressing the cell surface receptor PDGFR α , representing FAPs, were able to differentiate into adipocytes after muscle injury induced by glycerol in a mouse model of regeneration. Importantly, a study by Heredia *et al.*³⁹ subsequently confirmed that after muscle injury, PDGFR α was exclusively expressed by the FAPs. Other studies have also confirmed the *in vivo* adipogenic potential of FAPs.^{39,40}

Even though IMAT accumulation is strongly linked to many different physiological and/or pathological conditions, it seems that fatty infiltrations in muscles could be more related to the degree of inactivity. Indeed, several studies have demonstrated a negative correlation between physical activity and the amount of fatty infiltrations.^{9,12,24,25,41} A study by Manini *et al.*⁹ in healthy young adults highlighted IMAT content increases of 15% in the thighs and 20% in the calves after 4 weeks of unilateral lower limb suspension.

Interestingly, a longitudinal study by Leskinen *et al.*²⁴ also revealed that IMAT accumulation was greater in inactive co-twins compared with their active counterparts. Advancing age is often associated with reduced daily activity⁴² and an interesting study by Wroblewski *et al.*⁴³ showed that old elite athletes do not exhibit any increase in IMAT amount with ageing, highlighting again inactivity as a major regulator of IMAT development. Thus, deciphering the processes of IMAT development thanks to muscle disuse models is of great importance to further make up strategies to limit it.

In recent decades, the scientific community has validated several selected cell, animal, and human experimental models for studying muscle wasting processes. Currently, ground-based models of simulated microgravity protocols contribute largely to scientific studies exploring muscle deconditioning and ageing.^{5,12} Continuous exposure to bed rest in a head-down tilt position has been one of the most used models of simulated microgravity. Studies using this model have produced and continue to generate a large amount of data concerning the effects of inactivity on healthy individuals.^{15,44–48} However, the dry immersion (DI) model of simulated microgravity appears to induce much quicker muscle deconditioning changes than what is observed in the head-down bed rest model.⁴⁹ The DI model involves immersing a subject in thermo-neutral water, and for a relatively short period, this model can faithfully reproduce most of the physiological effects of microgravity, including body fluid centralization, support unloading, and severe hypokinesia leading to muscle deconditioning.^{49,50} Originally used and described by Shulzhenko *et al.*,⁵¹ muscle atrophy following DI was observed by several authors, predominantly for slow fibres,^{52–55} and was associated with a decrease in sarcomere protein content.⁵⁵

We previously used the DI model of muscle deconditioning, and we did not find any difference in intramuscular fat content following 3 days of DI using MRI technique.⁵⁶ However, the MRI technique used does not allow for differentiation between intra- and extra-myocellular lipids, and one can question whether the MRI technique is accurate enough to detect small changes in IMAT content. Moreover, the absence of observed increase in intramuscular fat content does not preclude changes at the cellular and molecular level for IMAT development, particularly concerning FAP commitment into the adipogenic lineage. To date, only the study by Manini *et al.*⁹ has investigated the effects of a human ground-based model of muscle disuse on IMAT development, but no study has analysed the effects of a short period of inactivity. Moreover, the mechanisms leading to fatty infiltrations during sarcopenia or a sedentary lifestyle are poorly understood. We, therefore, took advantage of the DI model to investigate the effects of 3 days of DI on muscle IMAT development. In this study, we aimed to verify whether IMAT development starts within 3 days of DI, along with muscle deconditioning.

Material and methods

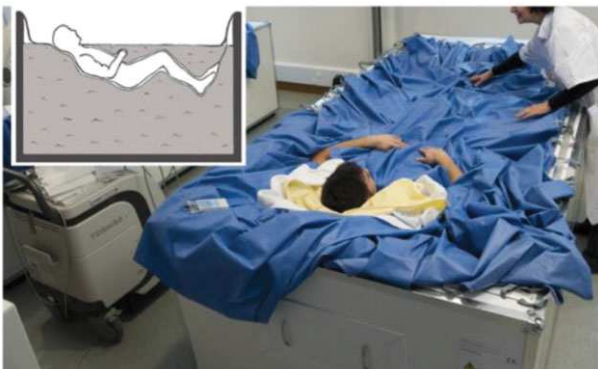
Subjects and ethics statement

Twelve healthy male subjects were selected for this experiment (age: 32 ± 5 ; height: 179 ± 7 cm; weight: 74.5 ± 7.2 kg; BMI: 23.5 ± 1.6). The subjects had no medical history or physical signs of neuromuscular disorders. The subjects were non-smokers and were not taking any drugs or medications. All subjects gave informed consent to the experimental procedures, which were approved by the local ethics committee (CPP Sud-Ouest outre-Mer I, France, number ID RCB: 2014-A00904-43) in accordance with the Declaration of Helsinki. All experiments were conducted at the Space Clinic of the Institute of Space Medicine and Physiology (Medes-IMPSP, Rangueil Hospital) in Toulouse (France) and were sponsored by the French National Space Agency (CNES).

Overall study design

This experiment consisted of a period of DI for 3 days with a 3 day ambulatory control period before DI and a 2-day recovery period after DI. In the ambulatory and recovery periods, all subjects remained active and ambulatory, and they were asked not to exercise during the 8 days of the study. During the DI period, the subjects remained immersed in a supine position in a controlled thermo-neutral water bath ($33 \pm 0.5^\circ\text{C}$) continuously, (Figure 1) except for daily 20 min extractions for toilet use and weighing (in bed rest position), and they were instructed not to produce any unnecessary movements with their limbs. The study was conducted in a quiet room at a stable temperature of 25°C . Each subject had a daily medical examination, and the MEDES team took several standardized measurements. For example, discomfort and psychological assessments were made via questionnaires, and body

Figure 1 Dry immersion experimental model (used with permission from Treffel *et al.*⁵⁷).



temperature was taken twice daily with a tympanic thermometer. During the 3 days of ambulatory period, the 3 days of DI and the 2 days recovery period, subjects received three solid meals/day during the study, with the requirement to finish all meals. The daily individual energy intake requirement was estimated using the World Health Organization equations by multiplying the resting metabolic rate with a physical activity level of 1.6 before and after DI and 1.3 during DI, as previously described by Arentson-Lantz *et al.*⁴⁸ Coffee, tea, alcohol, smoking, and drugs were prohibited throughout the experiment. Only paracetamol was allowed if needed. For more nutritional protocol details, see Demangel *et al.*⁵⁶

Muscle biopsy

Skeletal muscle biopsy was performed before DI (Pre-DI, 8–13 days before DI) and during the final day of DI (Post-DI, before reambulation) from the right *vastus lateralis* (VL) according to a well-established method using a 5 mm Bergström biopsy needle under sterile conditions and local anaesthesia (1% lidocaine).⁵⁸ Pre- and Post-DI biopsies were obtained from the same leg, as near to each other as possible, and for each biopsy, two pieces were selected with an optical microscope for histological analyses. One piece was immediately embedded in small silicone casts filled with a cryoprotector (OCT, Sakura Finetek), immediately frozen in liquid nitrogen, and stored at -80°C until further analysis. The other piece was immediately fixed overnight in 4% paraformaldehyde solution at room temperature for 24 h and then embedded in paraffin. The remaining biopsy was rapidly frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C for mRNA and protein content quantification.

Cryosectioning and immunohistochemistry

Transverse serial cross sections ($10 \mu\text{m}$ thick) of VL samples were obtained using a cryostat maintained at -25°C . Before labelling, the sections were dried and fixed for 10 min in acetone. The sections were then washed in phosphate-buffered saline (PBS), blocked and permeabilized with 0.1% Triton-X100 and 20% horse serum. The sections were incubated with selected primary antibodies for 1 h at 37°C , followed by washes in PBS and incubation with the secondary antibody for 1 h at 37°C . The fibre sizes were analysed with ImageJ (1.46r version) software.

Paraffin-embedded histological and immunohistochemical analyses

The muscle biopsies were fixed in 4% neutral-buffered formalin (24 h) and embedded in paraffin. The paraffin-embedded

tissues were sectioned (3 μm thick), and the sections were stained with haematoxylin/eosin/saffron (H/E/S). The stained slides were digitalized with a NanoZoomer slide scanner with a 40 \times objective (Hamamatsu). The other slides were preserved for subsequent immunohistochemical analyses.

The immunohistochemistry protocol was performed as previously described.^{10,59} Briefly, the skeletal muscle sections were deparaffinized, rehydrated, and incubated for antigen retrieval in EDTA buffer at 100°C for 30 min. The sections were incubated in 0.3% H₂O₂ for 20 min, and endogenous biotin was blocked using an Avidin-Biotin Blocking Kit (Vector Laboratories, CliniSciences). Non-specific antibody binding was blocked by incubation with TBS containing 20% normal goat serum for 30 min at RT. The sections were then incubated overnight at 4°C with anti-PDGFR α antibody diluted at 1:250 or non-specific rabbit IgG (Vector Laboratories, CliniSciences) at the same concentration. Antibody binding was revealed by the streptavidin-biotin-peroxidase complex method using an ABC Vectastain Kit and the peroxidase substrate 3,3'-Diaminobenzidine (Vector Laboratories, CliniSciences). Images were analysed with ImageJ (1.46r version) software.

mRNA extraction and real-time polymerase chain reaction (qPCR)

Total RNA was isolated from homogenized muscle samples using a miRNeasy Mini Kit according to the manufacturer's instructions (Qiagen). RNA concentration was determined by spectrophotometric analysis (Eppendorf AG, Hamburg, Germany), and integrity was checked with an Agilent 2100 bioanalyzer (Agilent Technologies) using an RNA 6000 Nano Kit according to the manufacturer's instructions.⁶⁰ Reverse transcription reaction was performed with 2 μg of total RNA using a RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific) according to the manufacturer's instructions. qPCR analysis was performed in a StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems) with 10 μL of KAPA SYBR Fast Universal Readymix (CliniSciences), 300 nM forward and reverse primers, 2 μL of diluted cDNA template and water to a final volume of 20 μL . The forward and reverse primers used to amplify genes are listed in Table 1. All PCRs were performed in duplicate using the following cycle

parameters: 20 s at 95°C, 40 cycles of 3 s at 95°C and 30 s at 60°C. The relative mRNA levels were normalized to β 2-microglobulin and cyclophilin A housekeeping gene levels, which were unaffected by the experiment. The results are expressed using the comparative cycle threshold. The relative changes in the level of a specific gene were calculated with the $\Delta\Delta\text{CT}$ formula.

Protein isolation and Western blotting

Muscle samples were homogenized in 10 volumes of lysis buffer [50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1 mM egtazic acid, 1 mM EDTA, 100 mM NaF, 5 mM Na₃VO₄, 1% Triton X-100, 1% sodium dodecyl sulfate (SDS), 40 mM β -glycerophosphate, and protease inhibitor mixture (P8340; Sigma-Aldrich)] and centrifuged at 10 000 g for 10 min (4°C). Sixty micrograms of protein extract was loaded into Stain-Free 4–20% precast gels (4568095; Bio-Rad) before electrophoretic transfer onto nitrocellulose membranes (Bio-Rad; Trans-Blot Turbo Blotting System). After transfer, the membranes were blocked with 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, and 0.1% Tween 20 (Tris-buffered saline-T) containing 5% skimmed milk or BSA and incubated overnight at 4°C with primary antibodies. The membranes were then incubated for 1 h with a peroxidase-conjugated secondary antibody. The immunoblots were revealed using a Pierce ECL kit (32106; Thermo Scientific), and proteins were visualized by enhanced chemiluminescence using the ChemiDoc Touch Imaging System and quantified with Image Lab™ Touch Software (version 5.2.1). Stain-Free technology was used as the loading control. A large number of methodological studies have already validated this technology and explained its functioning in detail.^{61–68}

Antibodies

Anti-laminin (L9393; 1:400) antibody was purchased from Sigma-Aldrich and secondary antibody Alexa Fluor 488 (A11029; 1:800) was purchased from Invitrogen. Anti-PDGFR α (#3174), anti-perilipin (#9349), anti-FABP4 (#3544) and anti-C/EBP α (#8178) primary antibodies were purchased from Cell

Table 1 Real-time PCR primers

Gene	Forward	Reverse	Amplicon size
C/EBP α	GACCAGAAAGCTGAGTTGTGAG	CCACAAAGCCCAGAAACCTA	69 BP
C/EBP β	CTCCAGGTAGGGGCTGAAGT	TTAGACCCATGGAAGTGGC	150 BP
Cyclophilin A	TTCCTCCTTTCACAGAATTATTCCA	CCGCCAGTGCCATTATGG	75 BP
PDGFR α	AAGACCTGGCAAGAGGAAC	GAACCTGTCTCGATGGCACT	67 BP
PPAR γ	GTGCCAGTTTCGATCCGTAGA	GGCCAGCATCGTGTAGATGA	142 BP
rpS9	CGGCCCGGGAGCTGTTGACG	CTGCTTGCCGACCCTAATGT	247 BP

Signalling and used at 1:500 dilution. Anti-PPAR γ (sc-7273) and anti-C/EBP β (sc-150) primary antibodies were purchased from Santa Cruz and used at 1:200 dilution. Anti-mouse (sc-2005) and anti-rabbit (sc-2004) HRP-conjugated secondary antibodies were purchased from Santa Cruz and used at 1:4000 dilution.

Statistics

All values are expressed as the mean \pm SEM, and the significance level was set at $P < 0.05$. Differences between Pre-DI and Post-DI were evaluated for significance using the paired Student's t -test or the Wilcoxon matched-pairs signed-rank test when the data deviated from a normal distribution (Shapiro–Wilk normality test). Statistics and graphs were made with GraphPad Prism6 Software.

Results

Dry immersion induces muscle atrophy

To validate the efficiency of DI as a muscle-deconditioning model, we first quantified the VL myofibers cross-sectional area (CSA). We observed a significant decrease in the global VL myofiber CSA, reaching 10.6% (Post-DI vs. Pre-DI, $P = 0.04$; Figure 2). The CSA before DI (Pre-DI) was 6283 μm^2 , in contrast to 5617 μm^2 at the end of the DI protocol (Post-DI). Therefore, DI rapidly promotes muscle deconditioning in VL.

Fatty infiltration markers are upregulated after 3 days of dry immersion

We aimed to verify whether IMAT development could arise concomitantly with muscle deconditioning within 3 days of DI. We thus quantified the expression of perilipin and fatty acid binding protein 4 (FABP4), the two major markers of mature adipocytes commonly used in the literature. We observed marked increases in the protein expression levels of perilipin and FABP4 after the dry immersion protocol (+80% [$P = 0.03$] and +40% [$P = 0.048$], respectively; Figure 3 a). In addition, we analysed IMAT adipocyte CSA and found an increase Post-DI (Figure 3b). Unfortunately, the number of subjects on which the IMAT CSA measurement could be done was too low to apply powerful statistical tools ($n = 4$ for Pre-DI and $n = 5$ for Post-DI), and this difference did not reach statistical significance ($P = 0.2$, Figure 3c).

Dry immersion enhances the expression of key adipogenic transcription factors

C/EBP β plays an important role during the early stages of adipogenic differentiation. Interestingly, we did not detect any significant differences in mRNA (-14% , $P = 0.23$) or protein levels ($+6\%$, $P = 0.414$) of C/EBP β after our simulated microgravity protocol (Figure 4a). In light of our previous results regarding mature adipocyte markers, which indicated that the adipogenic process was already greatly engaged, we hypothesized that the later markers of adipogenesis would be differentially expressed. We, therefore, analysed mRNA and protein levels of PPAR γ and C/EBP α . Surprisingly, no significant difference was detected for PPAR γ mRNA induction

Figure 2 Changes in cross-sectional area measurements after 3 days of dry immersion. Cross-sectional area (CSA) measurement of all myofibers from vastus lateralis muscle biopsies taken before (Pre-DI) and after (Post-DI) 3 days of dry immersion (DI) with representative transversal muscle sections. * $P < 0.05$.

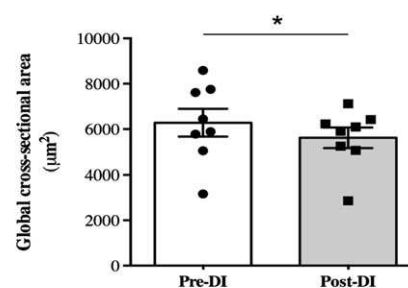
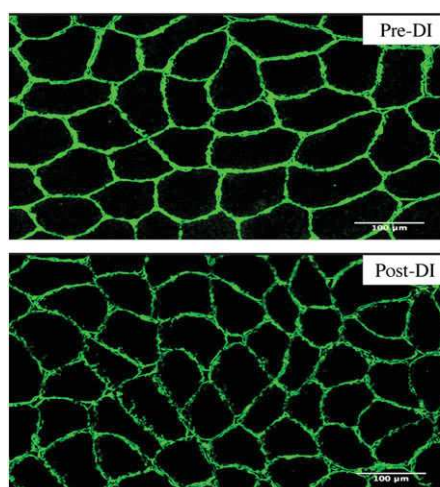
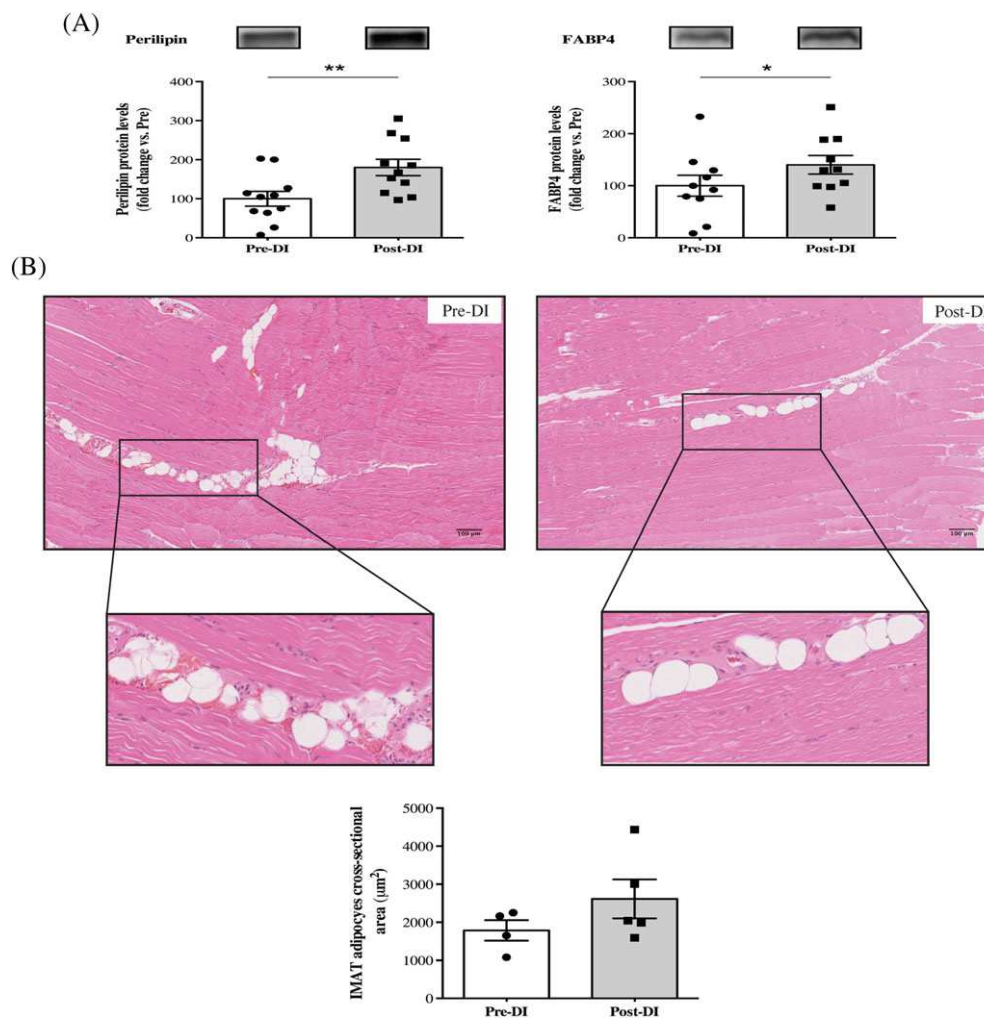


Figure 3 Changes in intermuscular adipose tissue deposition after 3 days of dry immersion. (A) Perilipin and fatty acid binding protein 4 (FABP4) protein levels from vastus lateralis muscle biopsies taken >before (Pre-DI) and after (Post-DI) 3 days of dry immersion (DI). (B) Representative histological longitudinal paraffin-embedded vastus lateralis muscle sections that were obtained from Pre-DI and Post-DI muscle biopsies are shown with haematoxylin–eosin–safran staining. Intermuscular adipose tissue (IMAT) adipocyte cross-sectional area measurements are shown in μm^2 . * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$.



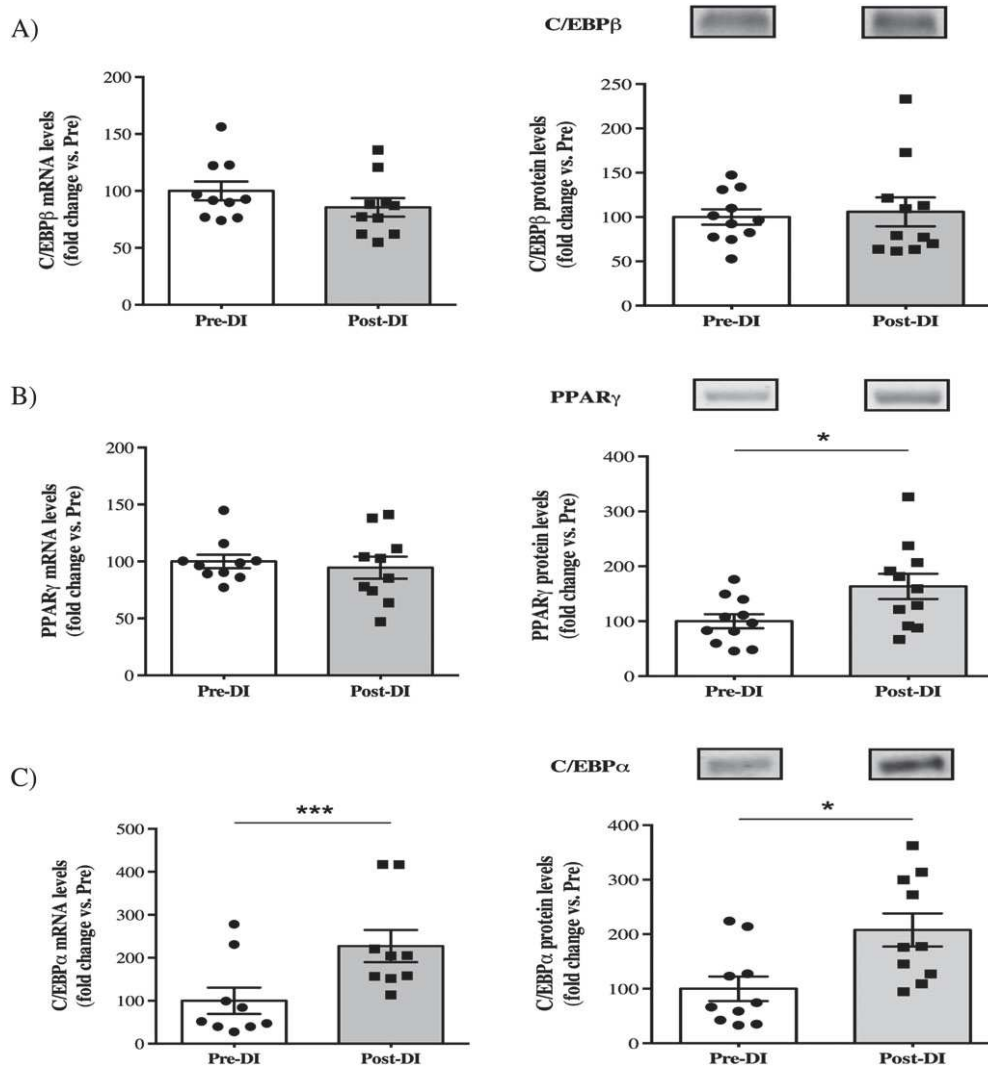
(-5% , $P = 0.21$), whereas an increase in $\text{PPAR}\gamma$ protein expression ($+64\%$, $P = 0.038$; Figure 4b) was observed. Moreover, $\text{C/EBP}\alpha$ protein expression increased after dry immersion ($+108\%$, $P = 0.022$), and we observed a similar increase in $\text{C/EBP}\alpha$ mRNA induction ($+127\%$, $P = 0.0006$; Figure 4c). Consistent with the results for mature adipocyte markers, the elevated expression of $\text{C/EBP}\alpha$ and $\text{PPAR}\gamma$ after 3 days of DI may also indicate an increase in the late adipogenic processes, leading to IMAT development.

Dry immersion promotes fibro-adipogenic progenitor proliferation

At least in mice, FAPs are well-known as the major muscle-resident stem cells implicated in the development of IMAT.

We hypothesized that these mesenchymal stem cells, which are positive for and identified in many studies with the cell surface marker $\text{PDGFR}\alpha$, were implicated in the IMAT development observed in our study. We, therefore quantified the mRNA induction and protein levels of $\text{PDGFR}\alpha$ after 3 days of DI. We found a minor but significant decrease in the mRNA induction of $\text{PDGFR}\alpha$ (-15% , $P = 0.019$; Figure 5a), whereas the protein levels were clearly enhanced ($+47\%$, $P = 0.007$; Figure 5a). The change in protein levels was then confirmed by our immunohistochemical analysis ($+26\%$, $P = 0.022$; Figure 5b). Therefore, in parallel with an increase in mature adipocyte markers and $\text{C/EBP}\alpha$, the increase in $\text{PDGFR}\alpha$ expression probably underlines FAP proliferation in response to 3 days of DI. In an unfavourable environment, these FAPs are known to drive IMAT development.

Figure 4 Changes in key adipogenic markers after 3 days of dry immersion. (A) Changes in C/EBP β mRNA and protein levels in vastus lateralis muscle biopsies taken before (Pre-DI) and after (Post-DI) 3 days of dry immersion (DI). (B) Changes in PPAR γ mRNA and protein levels in Pre-DI and Post-DI muscle biopsies. (C) Changes in C/EBP α mRNA and protein levels in Pre-DI and Post-DI muscle biopsies. * $P < 0,05$ and *** $P < 0.001$.



Dry immersion does not increase the expression of fibrosis mRNA markers

FAPs are known to be able to differentiate into either adipocytes or fibroblasts. Therefore, we also quantified some key markers to evaluate the increase in extracellular matrix deposition, leading to fibrosis deposition (Figure 6). We found a clear decrease in the mRNA induction of α -SMA (-60% ; $P = 0.0002$) and connective tissue growth factor (-50% , $P = 0.001$) after 3 days of DI. Moreover, we did not find any differences in the mRNA induction of fibronectin (-10% , $P = 0.197$) and type 1 α collagen (Col1a1; $+104\%$, $P = 0.148$). These results may indicate that dry immersion for 3 days does not promote fibrosis development.

Discussion

Identification of cost-effective interventions to maintain muscle mass, muscle strength, and physical performance is a major public health challenge. It requires understanding the cellular, molecular, and systemic mechanisms as well as the underlying pathways involved in muscle deconditioning development. In the past decade, studies have increasingly recognized the importance of fatty infiltrations for the age-mediated loss of skeletal-muscle function and emphasized that this new important factor is closely linked to inactivity. Therefore, the main objective of this study was to characterize the effects of rapid and profound inactivity on the early mechanisms of IMAT development. For that purpose, we

Figure 5 Changes in the fibro-adipogenic progenitor cell surface marker PDGFR α after 3 days of dry immersion. (A) Changes in PDGFR α mRNA and protein levels in vastus lateralis muscle biopsies taken before (Pre-DI) and after (Post-DI) 3 days of dry immersion (DI). (B) Representative histological transversal paraffin-embedded vastus lateralis muscle sections that were taken from Pre-DI and Post-DI muscle biopsies are immunostained with PDGFR α antibody. (C) Quantification of the PDGFR α -positive signals. * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$.

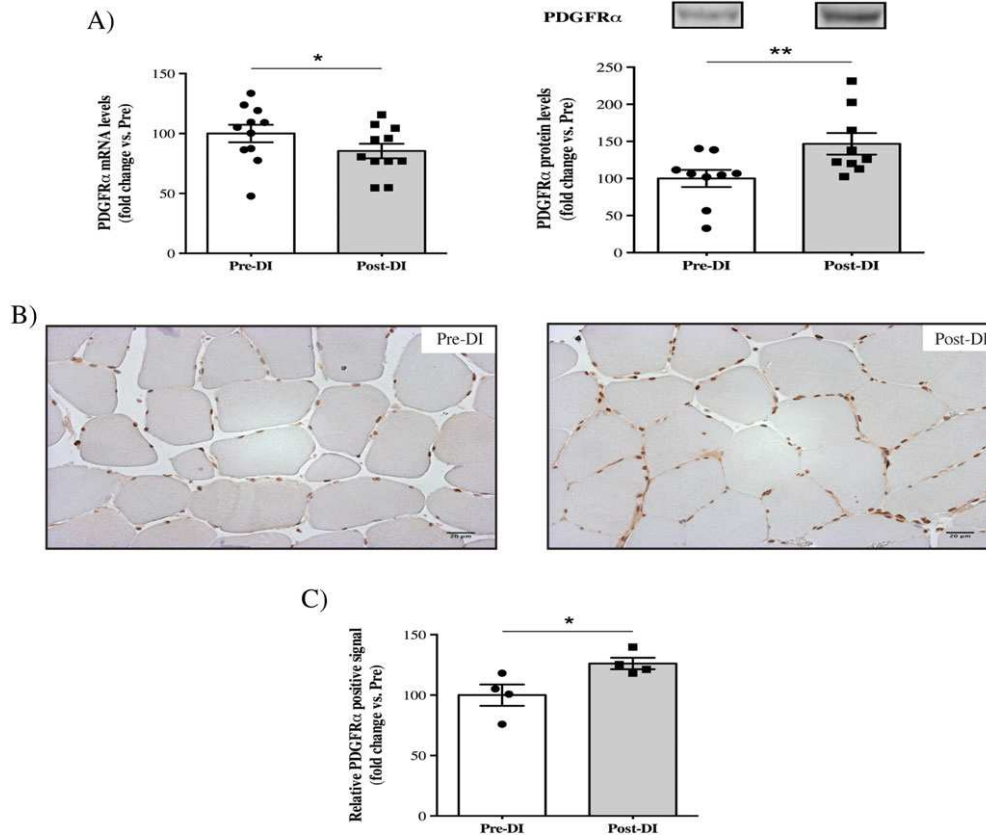
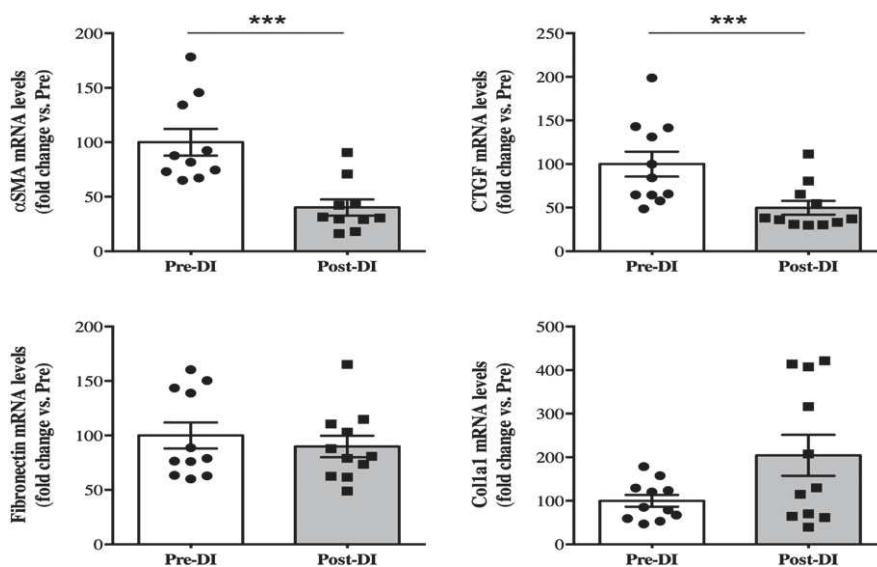


Figure 6 Changes in key fibrosis markers after 3 days of dry immersion. Changes in α -smooth muscle actin, connective tissue growth factor (CTGF), fibronectin, and Col1a1 mRNA levels in vastus lateralis muscle biopsies taken before (Pre-DI) and after (Post-DI) 3 days of dry immersion (DI). *** $P < 0.001$.



used the innovative muscle-deconditioning model of DI model, for the first time in Europe in this experiment. Our study shows for the first time that severe inactivity for only 3 days was able to induce increased expression of the key markers of IMAT development, concomitant with muscle deconditioning.

Skeletal muscle atrophy in humans has already been observed in many studies related to muscle unloading but mainly using long-duration protocols.^{5,15,69–71} Indeed, few studies have examined the effects on muscle unloading over short periods. The study by Edgerton *et al.*⁷² demonstrated a significant decrease in VL CSA after 11 days of real space flight (–16% for MyHCI and –36% for MyHCII). Within the specific context of DI, a decrease in the CSA of both slow and fast myofibers has already been reported after 3 days (5–9%) and 7 days (15–18%).^{49,55} In our study, we observed a global decrease in VL myofiber CSA after only 3 days of DI (10.6%). Our results are thus in accordance with those of previous studies, demonstrating that conducting this protocol for only 3 days is able to induce muscle atrophy.

Our study was dedicated to investigating IMAT development. Fatty infiltration development is an important characteristic of muscle deconditioning and has been particularly studied in relation to ageing, obesity or inactivity.^{12,19} No study conducted in humans has examined the effects of microgravity or simulated microgravity on specific IMAT development. In a closed context, Manini *et al.*⁹ have demonstrated that unilateral limb suspension of healthy young adults for 4 weeks was sufficient to induce a major increase in the IMAT content. Indeed, these authors found IMAT content increases of approximately 15% in the thighs and 20% in the calves of young healthy men. In our study, we found a clear increase in two key mature adipocytes markers: FABP4 and perilipin. These two markers are commonly used in the literature to evaluate IMAT deposition,^{10,38,39,73,74} and their increase highlights that DI for only 3 days might induce IMAT accumulation or at least their development. These results were supported by increases in the mRNA and protein expression levels of key adipogenic markers after DI. Indeed, we found clear increases in the protein expression levels of PPAR γ and C/EBP α , while only the mRNA level of C/EBP α was enhanced. PPAR γ and C/EBP α are transcription factors that are required to induce adipocyte development, and their deletion in mice leads to adipocyte formation dysfunction and premature death.^{75–78} Taken together, these results emphasize that muscle deconditioning for only 3 days was able to promote fatty infiltration development. This result must be linked with that of St-Jean-Pelletier *et al.*⁷⁹ who showed that a sedentary lifestyle more than ageing *per se* was related to an increase in intramyocellular lipid content in type I muscle fibres. We did not study here the intramyocellular lipid content, but it will be interesting in future muscle disuse experiments to verify if it increases parallel to IMAT development. Thus, age-related IMAT and fibre-type specific

intramyocellular content seem to evolve concomitantly, with physical inactivity more than aging being the discriminant factor. In the same way, because obesity is linked to sedentary lifestyle, a prior history of obesity could be responsible of large inter-individual variability in IMAT development in such models.⁸⁰

Another point raised by our study was the expected increase in the expression of PDGFR α , a key cell surface marker of FAPs. According to recent animal studies focused on IMAT development and muscle-resident stem cells, FAPs may be the main sources of IMAT during altered muscle homeostasis.^{38–40,74,81,82} More recent studies conducted in humans also suggest that FAPs may be the stem cell population that promotes IMAT development.^{83–85} Our study is the first to show an increase in PDGFR α expression, indicative of FAP proliferation, after 3 days of DI-mediated muscle deconditioning. In this unfavourable muscular environment, FAPs may be the main source of fatty infiltration development. Indeed, numerous papers have already demonstrated that FAPs are highly influenced by their environment. For example, Uezumi *et al.*³⁸ showed that FAPs isolated from glycerol-injected muscles did not differentiate into adipocytes in CTX-injected muscles, and in contrast, those isolated from cardiotoxin-injected muscles accumulated in degenerated areas and differentiated into adipocytes in glycerol-injected muscles. Interestingly, Mozzetta *et al.*⁸¹ showed that FAPs were sensitive to adipogenesis inhibition mediated by HDAC inhibitors in young mdx mice, while the same treatment was not as effective in old mdx mice. These studies clearly showed that the surrounding muscle environment largely regulates the fate of FAPs. In our study, we found increased expression of many key markers linked to mature adipocyte accumulation and adipogenesis, but we did not observe increases in fibrosis markers. These results indicate a probable increase in IMAT content in the absence of fibrosis development. Therefore, one could hypothesize that the muscle-deconditioning environment created by only 3 days of DI would favour FAP proliferation and drive these cells to an adipogenic lineage instead of a fibrogenic one, thereby leading to ectopic adiposity in muscles.

One of the most striking results of our study is that if we assume that FAPs are the main source of ectopic adiposity in muscles, then PDGFR α -positive FAPs were activated and able to differentiate into mature adipocytes after only 3 days of muscle deconditioning. Classification and properties of muscle-resident progenitors, including FAPs, have not been fully characterized. Satellite cells (SCs), the most studied stem cells in skeletal muscle, are known to have different proliferation and differentiation abilities.^{86–90} For example, Rantanen *et al.*⁹¹ observed an increase in myogenin mRNA as early as 4 and 8 h after injury. Thus, in a few hours after injury, some SCs are already able to differentiate, even before the first signs of SC proliferation, which appeared only 24 h post-injury in that study. In addition, a study by Drummond

*et al.*⁹² also demonstrated an increase in myogenin protein expression 6 h after resistance exercise (generating micro lesions), whereas MyoD protein expression remained unchanged until 48 h after exercise. These studies suggested that an SCs subpopulation could differentiate immediately after muscle injury without entering into the proliferation stage, instead of the well-known proliferation and differentiation phases of the major SC populations. To reconcile our results that showed an increase in late adipogenic markers only (PPAR γ and C/EBP α), one can hypothesize that similar to these SCs, FAPs may constitute a heterogeneous population and have a subset that is able to differentiate early under muscle disuse conditions.

Limitations and conclusion

It is important to note that our study was conducted in healthy and physically active adult men, and that IMAT development often associated with sarcopenia, frailty, insulin-resistance, and mobility limitations states^{12,19,93} may respond differently to inactivity depending on the individual's gender, age, prior obesity and/or physical activity levels.^{21,79,80,94,95} For example, it could be interesting and helpful to study muscle disuse induced IMAT development in individuals with a prior history of obesity compared to lean ones in order to fully understand the different mechanisms underlying these variations. This would allow one to ask whether childhood BMI of our subjects could explain the inter-individual variations found in our study for IMAT development. Therefore, future studies are needed to investigate and understand IMAT development in selected populations.

To conclude, our study is the first to show that a short period of muscle disuse, mediated by the innovative dry immersion model, is able to induce IMAT development con-

comitant with muscle deconditioning. Our study also reveals that FAPs could be the resident muscle stem cell population implicated in IMAT development. Further studies are needed to explore efficient strategies to counteract this phenomenon that impairs muscle function.

Acknowledgements

We would particularly like to thank all the staff working in the Space Clinic of the Institute of Space Medicine and Physiology (Medes-IMPS) in Toulouse for having organized and carried out these experiments, especially Marie-Pierre Bareille and Arnaud Beck. We want to thank Professors Jacques Mercier and Maurice Hayot for their excellent biopsy procedures and the subjects for their participation in this project. We also greatly acknowledge the 'Réseau d'Histologie Expérimentale de Montpellier' (RHEM) platform for histology core facilities and paraffin processing of the muscle biopsies, especially Nelly Pirot, Florence Bernex, Charlène Berthet, Yohan Noël, and Laura De Oliveira. We also thank Nadine Adam for her helpful English corrections. The authors of this manuscript certify that they have complied with ethical guidelines for authorship and publishing in the Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle.⁹⁶

This work was supported by the Centre National d'Etudes Spatiales (CNES).

Conflict of interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

References

1. Reid KF, Fielding RA. Skeletal muscle power: a critical determinant of physical functioning in older adults. *Exerc Sport Sci Rev* 2012;**40**:4–12.
2. Sartorelli V, Fulco M. Molecular and cellular determinants of skeletal muscle atrophy and hypertrophy. *Science's STKE : signal transduction knowledge environment* 2004;**2004**: re11.
3. Egan B, Zierath JR. Exercise metabolism and the molecular regulation of skeletal muscle adaptation. *Cell Metab* 2013;**17**:162–184.
4. Begue G, Douillard A, Galbes O, Rossano B, Vernus B, Candau R, et al. Early activation of rat skeletal muscle IL-6/STAT1/STAT3 dependent gene expression in resistance exercise linked to hypertrophy. *PLoS one* 2013;**8**: e57141.
5. Baldwin KM, Haddad F, Pandorf CE, Roy RR, Edgerton VR. Alterations in muscle mass and contractile phenotype in response to unloading models: role of transcriptional/pretranslational mechanisms. *Front Physiol* 2013;**4**:284.
6. Cros N, Muller J, Bouju S, Pietu G, Jacquet C, Leger JJ, et al. Upregulation of M-creatine kinase and glyceraldehyde3-phosphate dehydrogenase: two markers of muscle disuse. *Am J Physiol* 1999;**276**:R308–R316.
7. Hanson AM, Harrison BC, Young MH, Stodieck LS, Ferguson VL. Longitudinal characterization of functional, morphologic, and biochemical adaptations in mouse skeletal muscle with hindlimb suspension. *Muscle Nerve* 2013;**48**: 393–402.

8. Kawashima S, Akima H, Kuno SY, Gunji A, Fukunaga T. Human adductor muscles atrophy after short duration of unweighting. *Eur J Appl Physiol* 2004;**92**:602–605.
9. Manini TM, Clark BC, Nalls MA, Goodpaster BH, Ploutz-Snyder LL, Harris TB. Reduced physical activity increases intermuscular adipose tissue in healthy young adults. *Am J Clin Nutr* 2007;**85**:377–384.
10. Pagano AF, Demangel R, Briocche T, Jublanc E, Bertrand-Gaday C, Candau R, et al. Muscle regeneration with intermuscular adipose tissue (IMAT) accumulation is modulated by mechanical constraints. *PLoS one* 2015;**10**: e0144230.
11. Chopard A, Hillock S, Jasmin BJ. Molecular events and signalling pathways involved in skeletal muscle disuse-induced atrophy and the impact of countermeasures. *J Cell Mol Med* 2009;**13**:3032–3050.
12. Briocche T, Pagano AF, Py G, Chopard A. Muscle wasting and aging: experimental models, fatty infiltrations, and prevention. *Mol Aspects Med* 2016; <https://doi.org/10.1016/j.mam.2016.04.006>.
13. Cruz-Jentoft AJ, Baeyens JP, Bauer JM, Boirie Y, Cederholm T, Landi F, et al. Sarcopenia: European consensus on definition and diagnosis: Report of the European Working Group on Sarcopenia in Older People. *Age Ageing* 2010;**39**:412–423.
14. Fielding RA, Vellas B, Evans WJ, Bhasin S, Morley JE, Newman AB, et al. Sarcopenia: an undiagnosed condition in older adults. Current consensus definition: prevalence, etiology, and consequences. International working group on sarcopenia. *J Am Med Dir Assoc* 2011;**12**:249–256.
15. Berg HE, Larsson L, Tesch PA. Lower limb skeletal muscle function after 6 wk of bed rest. *J Appl Physiol* (1985) 1997;**82**: 182–188.
16. Delmonico MJ, Harris TB, Visser M, Park SW, Conroy MB, Velasquez-Mieyer P, et al. Longitudinal study of muscle strength, quality, and adipose tissue infiltration. *Am J Clin Nutr* 2009;**90**:1579–1585.
17. Di Prampero PE, Narici MV. Muscles in microgravity: from fibres to human motion. *J Biomech* 2003;**36**:403–412.
18. Jubrias SA, Odderson IR, Esselman PC, Conley KE. Decline in isokinetic force with age: muscle cross-sectional area and specific force. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 1997;**434**:246–253.
19. Addison O, Marcus RL, Lastayo PC, Ryan AS. Intermuscular fat: a review of the consequences and causes. *International journal of endocrinology* 2014;**2014**:309570.
20. Vettor R, Milan G, Franzin C, Sanna M, De Coppi P, Rizzuto R, et al. The origin of intermuscular adipose tissue and its pathophysiological implications. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2009;**297**:E987–E998.
21. Marcus RL, Addison O, Kidde JP, Dibble LE, Lastayo PC. Skeletal muscle fat infiltration: impact of age, inactivity, and exercise. *J Nutr Health Aging* 2010;**14**:362–366.
22. Sciorati C, Clementi E, Manfredi AA, Rovere-Querini P. Fat deposition and accumulation in the damaged and inflamed skeletal muscle: cellular and molecular players. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 2015; <https://doi.org/10.1007/s00018-015-1857-7>.
23. Uezumi A, Ikemoto-Uezumi M, Tsuchida K. Roles of nonmyogenic mesenchymal progenitors in pathogenesis and regeneration of skeletal muscle. *Front Physiol.* 2014;**5**:68.
24. Leskinen T, Sipilä S, Alen M, Cheng S, Pietiläinen KH, Usenius JP, et al. Leisure-time physical activity and high-risk fat: a longitudinal population-based twin study. *Int J Obes (Lond)* 2009;**33**:1211–1218.
25. Tuttle LJ, Sinacore DR, Cade WT, Mueller MJ. Lower physical activity is associated with higher intermuscular adipose tissue in people with type 2 diabetes and peripheral neuropathy. *Phys Ther* 2011;**91**: 923–930.
26. Ceylan O, Seyfettinoglu F, Dulgeroglu AM, Avci A, Bayram B, Bora OA. Histomorphological comparison of immobilization and denervation atrophies. *Acta Orthop Traumatol Turc* 2014;**48**:320–325.
27. Dular JP, Cambon B, Vigneron P, Reyne Y, Nougues J, Casteilla L, et al. Expression of specific white adipose tissue genes in denervation-induced skeletal muscle fatty degeneration. *FEBS Lett* 1998;**439**:89–92.
28. Gallagher D, Heshka S, Kelley DE, Thornton J, Bort L, Pi-Sunyer FX, et al. Changes in adipose tissue depots and metabolic markers following a 1-year diet and exercise intervention in overweight and obese patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2014;**37**:3325–3332.
29. Goodpaster BH, Kelley DE, Wing RR, Meier A, Thaete FL. Effects of weight loss on regional fat distribution and insulin sensitivity in obesity. *Diabetes* 1999;**48**: 839–847.
30. Karampinos DC, Baum T, Nardo L, Alizai H, Yu H, Carballido-Gamio J, et al. Characterization of the regional distribution of skeletal muscle adipose tissue in type 2 diabetes using chemical shift-based water/fat separation. *Journal of magnetic resonance imaging : JMRI* 2012;**35**:899–907.
31. Kuzel BR, Grindel S, Papandrea R, Ziegler D. Fatty infiltration and rotator cuff atrophy. *J Am Acad Orthop Surg* 2013;**21**: 613–623.
32. Laron D, Samagh SP, Liu X, Kim HT, Feeley BT. Muscle degeneration in rotator cuff tears. *J Shoulder Elbow Surg* 2012;**21**: 164–174.
33. Song MY, Ruts E, Kim J, Janumala I, Heymsfield S, Gallagher D. Sarcopenia and increased adipose tissue infiltration of muscle in elderly African American women. *Am J Clin Nutr* 2004;**79**:874–880.
34. Tuttle LJ, Sinacore DR, Mueller MJ. Intermuscular adipose tissue is muscle specific and associated with poor functional performance. *J Aging Res* 2012;**2012**: 172957.
35. Beavers KM, Beavers DP, Houston DK, Harris TB, Hue TF, Koster A, et al. Associations between body composition and gait-speed decline: results from the Health, Aging, and Body Composition study. *Am J Clin Nutr* 2013;**97**:552–560.
36. Visser M, Goodpaster BH, Kritchevsky SB, Newman AB, Nevitt M, Rubin SM, et al. Muscle mass, muscle strength, and muscle fat infiltration as predictors of incident mobility limitations in well-functioning older persons. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2005;**60**:324–333.
37. Schafer AL, Vittinghoff E, Lang TF, Sellmeyer DE, Harris TB, Kanaya AM, et al. Fat infiltration of muscle, diabetes, and clinical fracture risk in older adults. *J Clin Endocrinol Metab* 2010;**95**:E368–E372.
38. Uezumi A, Fukada S, Yamamoto N, Takeda S, Tsuchida K. Mesenchymal progenitors distinct from satellite cells contribute to ectopic fat cell formation in skeletal muscle. *Nat Cell Biol* 2010;**12**:143–152.
39. Heredia JE, Mukundan L, Chen FM, Mueller AA, Deo RC, Locksley RM, et al. Type 2 innate signals stimulate fibro/adipogenic progenitors to facilitate muscle regeneration. *Cell* 2013;**153**:376–388.
40. Uezumi A, Ito T, Morikawa D, Shimizu N, Yoneda T, Segawa M, et al. Fibrosis and adipogenesis originate from a common mesenchymal progenitor in skeletal muscle. *J Cell Sci* 2011;**124**:3654–3664.
41. Farr JN, Van Loan MD, Lohman TG, Going SB. Lower physical activity is associated with skeletal muscle fat content in girls. *Med Sci Sports Exerc* 2012;**44**:1375–1381.
42. Derbre F, Gratas-Delamarche A, Gomez-Cabrera MC, Vina J. Inactivity-induced oxidative stress: a central role in age-related sarcopenia? *European journal of sport science* 2014;**14**:S98–108.
43. Wroblewski AP, Amati F, Smiley MA, Goodpaster B, Wright V. Chronic exercise preserves lean muscle mass in masters athletes. *Phys Sportsmed* 2011;**39**:172–178.
44. Buehlmeier J, Mulder E, Noppe A, Frings-Meuthen P, Angerer O, Rudwilt F, et al. A combination of whey protein and potassium bicarbonate supplements during head-down-tilt bedrest: presentation of a multidisciplinary randomized controlled trial (MEPstudy). *Acta Astronaut* 2013;**95**: 82–91.
45. Chopard A, Arrighi N, Carnino A, Marini JF. Changes in dysferlin, proteins from dystrophin glycoprotein complex, costameres, and cytoskeleton in human soleus and vastus lateralis muscles after a long-term bedrest with or without exercise. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 2005;**19**:1722–1724.
46. Chopard A, Lecunff M, Danger R, Lamirault G, Bihouée A, Teusan R, et al. Large-scale mRNA analysis of female skeletal muscles during 60 days of bed rest with and without exercise or dietary protein supplementation as countermeasures. *Physiol Genomics* 2009;**38**:291–302.
47. Mutin-Carnino M, Carnino A, Roffino S, Chopard A. Effect of muscle unloading, reloading and exercise on inflammation during a head-down bed rest. *Int J Sports Med* 2014;**35**:28–34.
48. Arentson-Lantz E, English KL, Paddon-Jones D, Fry CS. 14 days of bed rest induces a decline in satellite cell content and robust

- atrophy of skeletal muscle fibers in middle-aged adults. *J Appl Physiol (1985)* 2016; jap 00799 2015. doi:https://doi.org/10.1152/jap00799.2015.
49. Navasiolava NM, Custaud MA, Tomilovskaya ES, Larina IM, Mano T, Gauquelin-Koch G, et al. Long-term dry immersion: review and prospects. *Eur J Appl Physiol* 2011;**111**:1235–1260.
 50. Treffel L, Mkhitarian K, Gellee S, Gauquelin-Koch G, Gharib C, Blanc S, et al. Intervertebral Disc Swelling Demonstrated by 3D and Water Content Magnetic Resonance Analyses after a 3-Day Dry Immersion Simulating Microgravity. *Front Physiol* 2016;**7**:605.
 51. Shulzhenko EB, Vil-Vilyams IF, Khudyakova MA, Grigoryev AI. Deconditioning during prolonged immersion and possible countermeasures. *Life Sci Space Res* 1976;**14**: 289–294.
 52. Litvinova KS, Vikhlyantsev IM, Kozlovskaya IB, Podlubnaya ZA, Shenkman BS. Effects of artificial support stimulation on fiber and molecular characteristics of soleus muscle in men exposed to 7-day dry immersion. *Journal of gravitational physiology : a journal of the International Society for Gravitational Physiology*. 2004;**11**: P131–P132.
 53. Moukhina A, Shenkman B, Blottner D, Nemirovskaya T, Lemesheva Y, Puttmann B, et al. Effects of support stimulation on human soleus fiber characteristics during exposure to 'dry' immersion. *Journal of gravitational physiology : a journal of the International Society for Gravitational Physiology* 2004;**11**:P137–P138.
 54. Shenkman BS, Kozlovskaya IB, Nemirovskaya TL, Tcheglova IA. Human muscle atrophy in supportlessness: effects of short-term exposure to dry immersion. *Journal of gravitational physiology : a journal of the International Society for Gravitational Physiology*. 1997;**4**: P137–P138.
 55. Shenkman BS, Podlubnaia ZA, Vikhlyantsev IM, Litvinova KS, Udal'tsov SN, Nemirovskaya TL, et al. Human soleus fibers contractile characteristics and sarcomeric cytoskeletal proteins after gravitational unloading. Contribution of support stimulus. *Biofizika* 2004;**49**:881–890.
 56. Demangel R, Treffel L, Py G, Briche T, Pagano AF, Bareille MP, et al. Early structural and functional signature of 3-day human skeletal muscle disuse using the dry immersion model. *J Physiol* 2017;https://doi.org/10.1113/JP273895.
 57. Treffel L, Dmitrieva L, Gauquelin-Koch G, Custaud MA, Blanc S, Gharib C, et al. Craniomandibular system and postural balance after 3-day dry immersion. *PLoS one* 2016;**11**: e0150052.
 58. Bergstrom J. Percutaneous needle biopsy of skeletal muscle in physiological and clinical research. *Scand J Clin Lab Invest* 1975;**35**:609–616.
 59. Pirot N, Delpech H, Deleuze V, Dohet C, Courtade-Saidi M, Basset-Leobon C, et al. Lung endothelial barrier disruption in Lyl1-deficient mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2014;**306**:L775–L785.
 60. Imbeaud S, Graudens E, Boulanger V, Barlet X, Zaborski P, Eveno E, et al. Towards standardization of RNA quality assessment using user-independent classifiers of microcapillary electrophoresis traces. *Nucleic Acids Res* 2005;**33**: e56.
 61. Vigelso A, Dybboe R, Hansen CN, Dela F, Helge JW, Guadalupe-Grau A. GAPDH and beta-actin protein decreases with aging making Stain-Free technology a superior loading control in Western blotting of human skeletal muscle. *J Appl Physiol (1985)* 2014; jap 00840 2014. doi:https://doi.org/10.1152/jap00840.2014.
 62. Faden F, Eschen-Lippold L, Dissmeyer N. Normalized quantitative Western blotting based on standardized fluorescent labeling. *Methods Mol Biol* 2016;**1450**:247–258.
 63. Zeitler AF, Gerrer KH, Haas R, Jimenez-Soto LF. Optimized semi-quantitative blot analysis in infection assays using the Stain-Free technology. *J Microbiol Methods* 2016;**126**:38–41.
 64. Gilda JE, Gomes AV. Western blotting using in-gel protein labeling as a normalization control: stain-free technology. *Methods Mol Biol* 2015;**1295**:381–391.
 65. Rivero-Gutierrez B, Anzola A, Martinez-Augustin O, de Medina FS. Stain-free detection as loading control alternative to Ponceau and housekeeping protein immunodetection in Western blotting. *Anal Biochem* 2014;**467**:1–3.
 66. Gilda JE, Gomes AV. Stain-Free total protein staining is a superior loading control to beta-actin for Western blots. *Anal Biochem* 2013;**440**:186–188.
 67. Gurtler A, Kunz N, Gomolka M, Hornhardt S, Friedl AA, McDonald K, et al. Stain-Free technology as a normalization tool in Western blot analysis. *Anal Biochem* 2013;**433**:105–111.
 68. Colella AD, Chegenii N, Tea MN, Gibbins IL, Williams KA, Chataway TK. Comparison of Stain-Free gels with traditional immunoblot loading control methodology. *Anal Biochem* 2012;**430**:108–110.
 69. Trappe S, Costill D, Gallagher P, Creer A, Peters JR, Evans H, et al. Exercise in space: human skeletal muscle after 6 months aboard the International Space Station. *J Appl Physiol (1985)* 2009;**106**: 1159–1168.
 70. Trappe S, Trappe T, Gallagher P, Harber M, Alkner B, Tesch P. Human single muscle fibre function with 84 day bed-rest and resistance exercise. *J Physiol* 2004;**557**: 501–513.
 71. Fitts RH, Trappe SW, Costill DL, Gallagher PM, Creer AC, Colloton PA, et al. Prolonged space flight-induced alterations in the structure and function of human skeletal muscle fibres. *J Physiol* 2010;**588**: 3567–3592.
 72. Edgerton VR, Zhou MY, Ohira Y, Klitgaard H, Jiang B, Bell G, et al. Human fiber size and enzymatic properties after 5 and 11 days of spaceflight. *J Appl Physiol (1985)* 1995;**78**:1733–1739.
 73. Lukjanenko L, Brachat S, Pierrel E, Lach-Trifileff E, Feige JN. Genomic profiling reveals that transient adipogenic activation is a hallmark of mouse models of skeletal muscle regeneration. *PLoS one*. 2013;**8**: e71084.
 74. Joe AW, Yi L, Natarajan A, Le Grand F, So L, Wang J, et al. Muscle injury activates resident fibro/adipogenic progenitors that facilitate myogenesis. *Nat Cell Biol* 2010;**12**:153–163.
 75. Wu Z, Rosen ED, Brun R, Hauser S, Adelmant G, Troy AE, et al. Cross-regulation of C/EBP alpha and PPAR gamma controls the transcriptional pathway of adipogenesis and insulin sensitivity. *Mol Cell* 1999;**3**:151–158.
 76. Linhart HG, Ishimura-Oka K, DeMayo F, Kibe T, Repka D, Poindexter B, et al. C/EBPalpha is required for differentiation of white, but not brown, adipose tissue. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;**98**: 12532–12537.
 77. Barak Y, Nelson MC, Ong ES, Jones YZ, Ruiz-Lozano P, Chien KR, et al. PPAR gamma is required for placental, cardiac, and adipose tissue development. *Mol Cell* 1999;**4**:585–595.
 78. Rosen ED, Sarraf P, Troy AE, Bradwin G, Moore K, Milstone DS, et al. PPAR gamma is required for the differentiation of adipose tissue in vivo and in vitro. *Mol Cell* 1999;**4**:611–617.
 79. St-Jean-Pelletier F, Pion CH, Leduc-Gaudet JP, Sgarioto N, Zovile I, Barbat-Artigas S, 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**:213–228.
 80. Tyrovolas S, Koyanagi A, Olaya B, Ayuso-Mateos JL, Miret M, Chatterji S, et al. Factors associated with skeletal muscle mass, sarcopenia, and sarcopenic obesity in older adults: a multi-continent study. *J Cachexia Sarcopenia Muscle* 2016;**7**: 312–321.
 81. Mozzetta C, Consalvi S, Saccone V, Tierney M, Diamantini A, Mitchell KJ, et al. Fibroadipogenic progenitors mediate the ability of HDAC inhibitors to promote regeneration in dystrophic muscles of young, but not old Mdx mice. *EMBO Mol Med* 2013;**5**:626–639.
 82. Sohn J, Lu A, Tang Y, Wang B, Huard J. Activation of non-myogenic mesenchymal stem cells during the disease progression in dystrophic dystrophin/utrophin knock-out mice. *Hum Mol Genet* 2015;https://doi.org/10.1093/hmg/ddv125.
 83. Uezumi A, Fukada S, Yamamoto N, Ikemoto-Uezumi M, Nakatani M, Morita M, et al. Identification and characterization of PDGFRalpha(+) mesenchymal progenitors in human skeletal muscle. *Cell Death Dis* 2014;**5**: e1186.
 84. Laurens C, Louche K, Sengenès C, Coue M, Langin D, Moro C, et al. Adipogenic progenitors from obese human skeletal muscle give rise to functional white adipocytes that contribute to insulin

- resistance. *Int J Obes (Lond)* 2015;https://doi.org/10.1038/ijo.2015.193.
85. Arrighi N, Moratal C, Clement N, Giorgetti-Peraldi S, Peraldi P, Loubat A, et al. Characterization of adipocytes derived from fibro/adipogenic progenitors resident in human skeletal muscle. *Cell Death Dis* 2015;6: e1733.
86. Schultz E. Satellite cell proliferative compartments in growing skeletal muscles. *Dev Biol* 1996;175:84–94.
87. Tierney MT, Sacco A. Satellite cell heterogeneity in skeletal muscle homeostasis. *Trends Cell Biol* 2016;https://doi.org/10.1016/j.tcb.2016.02.004.
88. Motohashi N, Asakura A. Muscle satellite cell heterogeneity and self-renewal. *Front Cell Dev Biol* 2014;2:1.
89. Collins CA, Olsen I, Zammit PS, Heslop L, Petrie A, Partridge TA, et al. Stem cell function, self-renewal, and behavioral heterogeneity of cells from the adult muscle satellite cell niche. *Cell* 2005;122: 289–301.
90. Ono Y, Masuda S, Nam HS, Benezra R, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S. Slow-dividing satellite cells retain long-term self-renewal ability in adult muscle. *J Cell Sci* 2012;125:1309–1317.
91. Rantanen J, Hurme T, Lukka R, Heino J, Kalimo H. Satellite cell proliferation and the expression of myogenin and desmin in regenerating skeletal muscle: evidence for two different populations of satellite cells. *Lab Invest* 1995;72:341–347.
92. Drummond MJ, Conlee RK, Mack GW, Sudweeks S, Schaalje GB, Parcell AC. Myogenic regulatory factor response to resistance exercise volume in skeletal muscle. *Eur J Appl Physiol* 2010;108:771–778.
93. Coen PM, Goodpaster BH. Role of intramyocellular lipids in human health. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 2012;23:391–398.
94. Tipton KD. Gender differences in protein metabolism. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2001;4:493–498.
95. Makizako H, Shimada H, Doi T, Tsutsumimoto K, Lee S, Lee SC, et al. Age-dependent changes in physical performance and body composition in community-dwelling Japanese older adults. *J Cachexia Sarcopenia Muscle* 2017; 8:607–614.
96. von Haehling S, Morley JE, Coats AJ, Anker SD. Ethical guidelines for publishing in the Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle: update 2015. *J Cachexia Sarcopenia Muscle* 2015;6: 315–316.

ARTICLE 3

Regulation of mitochondrial activity controls the duration of skeletal muscle regeneration in response to injury

Lionel Tintignac, Laurence Pessemesse, Emilie Blanchet, Fabienne Cortade, Élodie Jublanc, Rémi Demangel, Guillaume Py, Chamroeun Sar, Marco Kaiser, Nitish Mittal, Gérard Cabello, Chantal Wrutniak-Cabello and François Casas (article soumis dans The Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle ; IF = 9,70).

ABSTRACT

28

29

30 **Background**

31 Sarcopenia is a hallmark of the ageing process and whereas the exact mechanisms driving sarcopenia
32 remain to be fully understood, mitochondria have emerged as central regulators of the ageing process.
33 Thyroid hormone plays a key role in skeletal muscle development and is a major regulator of
34 mitochondrial activity. We have previously identified a 43kDa truncated form of the nuclear receptor
35 TR α 1 (p43) which stimulates mitochondrial activity and we demonstrated *in vivo* that this receptor
36 regulates muscle mass as well as the metabolic and contractile features of skeletal muscle.

37 **Methods**

38 Using mouse models overexpressing p43 in skeletal muscle or lacking p43, we measured protein
39 synthesis and degradation and identified downstream targets of p43 in skeletal muscle. Last, we
40 studied whether p43 influence skeletal muscle regeneration after acute injury.

41 **Results**

42 Using 6 months old-mice, we found that the muscle hypertrophy consecutive to p43 loss is mainly
43 attributed to the activation of protein synthesis and the decreased protein degradation, whereas the
44 induction of autophagy mainly explained the muscle atrophy consecutive to p43 overexpression.
45 Results from RNA-seq analysis led us to identify new potential transcriptional targets of p43.
46 Moreover, acute muscle injury induced by cardiotoxin, (70 days kinetic) lead us to unravel
47 requirement of the p43 signaling pathway for satellite cells dependent muscle regeneration; strongly
48 delayed in the absence of p43; whereas the overexpression of the receptor enhances of the regeneration
49 process.

50 **Conclusions**

51 Taken together our data demonstrate that p43 and thyroid hormone, through the regulation of
52 mitochondrial activity, play an important role *in vivo* by regulating the skeletal muscle mass notably
53 through autophagy and by controlling the duration of skeletal muscle regeneration after acute injury.

54 **Abbreviations:** MyHC, Myosin Heavy Chain; TH, Thyroid Hormone; CTX, Carditoxin; TR, Thyroid
1
2 hormone Receptor; mTOR, mammalian Target Of Rapamycin; FoxO3, Forkhead box O3; Akt,
3
4 Serine-Threonine Kinase; ULK1, uncoordinated (UNC)-51-like autophagy-activating kinase 1;
5
6
7 57 AMPK, 5-AMP-activated protein kinase; mTORC1, mechanistic target of rapamycin complex 1;
8
9 58 PRAS40, AKT1 Substrate 1; p62/SQSTM1, Sequestosome 1; LC3, Microtubule Associated Protein 1
10
11 59 Light Chain 3; Gdf11, Growth Differentiation Factor 11; Nmrk2, Nicotinamide Riboside Kinase 2;
12
13 60 Ldh2, Lactate Dehydrogenase 2; Lrtm2, Leucine Rich Repeats And Transmembrane Domains 2;
14
15 61 Dkk3, Dickkopf WNT Signaling Pathway Inhibitor 3; Myh8, Myosin Heavy Chain 8; Kcnab1,
16
17 62 Potassium Voltage-Gated Channel Subfamily A Member Regulatory Beta Subunit 1; Kazald1, Kazal
18
19 63 Type Serine Peptidase Inhibitor Domain 1; Col24a1, Collagen Type XXIV Alpha 1 Chain; Pax7,
20
21 64 Paired Box 7; Myf5, Myogenic Factor 5 ; MyoD, Myogenic Differentiation 1; MAFbx, Muscle
22
23 65 Atrophy F-Box Protein; MuRF1, Muscle-Specific RING Finger Protein 1, ROS, Reactive Oxygen
24
25 66 Species; c-MYC, V-Myc Avian Myelocytomatosis Viral Oncogene Homolog; H&E, Hematoxylin and
26
27 67 eosin; PAF, paraformaldehyde; RT, Room Temperature; PBS, Phosphate Buffer Saline; BSA, Bovine
28
29 68 Serum Albumin.
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

INTRODUCTION

69

70

71 Sarcopenia is a hallmark of the ageing process. The sarcopenia is characterized by a reduction of
72 skeletal muscle mass, a decline in muscle strength (neuro muscular junction degeneration), reduced
73 satellite cell regeneration, replacement of muscle fibers with fat, and an increase in fibrosis. Whereas
74 the exact mechanisms responsible for sarcopenia are not fully understood up to now, mitochondria
75 have emerged as central regulators of the ageing process.

76 Thyroid hormone (TH) is a major regulator of muscle development and metabolism. It stimulates
77 muscle growth by increasing the number and diameter of muscle fibers (1, 2) and regulates the
78 contractile features of adult muscle fibers (3). TH is also a key regulator of mitochondrial activity.
79 These functions of TH involve both TH receptor α (TR α) and β (TR β). We have previously identified
80 a 43 Kda truncated form of the nuclear receptor TR α 1 (p43) which stimulates mitochondrial activity
81 (4-6). We showed *in vitro* that p43 overexpression stimulates mitochondrial activity and potentiates
82 terminal differentiation in myoblasts, whereas the inhibition of this pathway induces the reverse
83 changes through the control of myogenin, c-Myc, and calcineurin expression (7-9). In addition, p43
84 overexpression in these cells induces a prominent increase in type 1 fibers (Seyer, Grandemange et al.
85 2011). Moreover we demonstrated that *in vivo*, the specific overexpression of p43 in skeletal muscle
86 (p43-Tg) increases mitochondrial respiration and induces a shift in the metabolic and contractile
87 features of muscle fibers toward a slower and more oxidative phenotype (10). Conversely, p43
88 depletion in mice (p43^{-/-}) reduces mitochondrial respiratory chain activities and induces a shift toward
89 a faster and more glycolytic muscle fiber phenotype (11). In addition, whereas the absence of p43
90 leads to an increase of muscle mass (11), its overexpression induces muscle atrophy during aging (12).
91 These set of data indicate that p43 regulates muscle mass as well as the metabolic and contractile
92 features of myofibers through the modulation of mitochondrial activity. During ageing, progressive
93 waste of muscle results from an imbalance between protein synthesis and degradation combine with
94 defective regeneration, it would be important to better understand the molecular mechanisms

95 mediating p43 functions in skeletal muscle homeostasis and to determine its role in regeneration
1
2 96 process.

3
4 97 Thus, using our mouse models at 6 months of age, the aim of this study was to better understand
5
6 98 the molecular mechanisms responsible for p43 influences in skeletal muscle phenotype by (1)
7
8 99 investigating how p43 regulates protein synthesis and degradation pathways, and (ii) identifying
9
10 100 downstream targets of p43 in skeletal muscle using RNA-seq analysis. Last, we studied whether p43
11
12 101 influence skeletal muscle regeneration after acute injury induced by cardiotoxin.
13
14

15 102
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

METHODS

103

104 **Animals and Ethics statement**

105 Male mice were housed and maintained on a 12-hour light/dark cycle (lights on at 7:00 pm). Food
106 (A04, SAFE) and water were provided *ad libitum*. All animal experiments were performed according
107 to European directives (86/609/CEE and 2010/63/CEE) and approved by the Comité d'Ethique en
108 Matière d'Expérimentation Animale: Région Languedoc-Roussillon (CEEA-LR-12091). Our
109 institution guidelines for the care and use of laboratory animals were observed. Our animal facility is
110 approved by the Departmental Veterinary Services (No. C34-172-10) and our Ministry of Research
111 (No. 4962). P43^{-/-} mice, lacking specifically the mitochondrial T3 receptor p43 and p43-Tg mice were
112 generated in our team as described previously (10, 13). All mice used in these studies were back-
113 crossed more than ten times into the C57BL/6 background. We generated our colony by crossing p43-
114 ^{-/-} mice with WT C57BL/6J breeders, and generated future generations of WT controls. According to
115 the European Directive 2010-63-EU, mice were observed daily for the general health status and
116 mortality scoring. Any obvious signs of disease, injury and behavioral disorder indicating pain were
117 recorded. If signs persist for more than 48 hours the animal was euthanized by cervical dislocation.

118

119 **Skeletal Muscle Injury**

120 6-month-old male mice were used to study skeletal muscle regeneration. After anesthesia by
121 Isoflurane, 25 μ l of cardiotoxin (10 μ M in saline) (C9759, Sigma-Aldrich) was injected in the right
122 tibialis anterior muscle to induce muscle injury. The contralateral (uninjected) left tibialis anterior
123 muscle was used as control. Mice were euthanized 4, 10, 28 and 70 days afterward and the tibialis
124 muscles were collected. For each genotype (WT, p43^{-/-} and p43-Tg) and for each group (4, 10, 28 and
125 70 days), 6 mice were used.

126

127 **Autophagic flux quantification**

128 Autophagy flux was monitored by treating animals with colchicine (0,4 mg/kg), an established
129 inhibitor of microtubule-mediated delivery of autophagosome to lysosome (14, 15). Colchicine
130 (C9754, Sigma-Aldrich) was freshly solubilized in water at the concentration of 10mg/ml and then

131 diluted to 0.1 mg/ml in water prior to i.p. injection. Control mice received an equal volume of i.p.
132 water. The treatment was repeated four time every 12 h prior to muscle harvesting. In addition, to
133 colchicine we induced autophagy in mice by depriving them of food for 24h before sacrifice.

134

135 **Gene expression studies**

136 Total RNAs were extracted from Gastrocnemius muscle using Trizol and cDNAs were generated
137 using the PrimeScript™ 1st strand cDNA Synthesis Kit (Takara). Real-time PCR was performed using
138 the SYBR® Premix Ex Taq™ II (Takara) and an Applied Biosystems Step One Plus (Applied
139 Science). Gene expression was normalized to the expression of the housekeeping gene *Rps9* and is
140 expressed as means ± sem. Student's *t* test were used to determine all *p* values. Primer sequences are
141 listed in Table 1.

142

143 **RNA-Seq analysis**

144 Poly-A mRNA (poly A + RNA) were directly isolated from p43^{-/-}, p43-Tg and WT frozen
145 Gastrocnemius muscle samples with Dynabeads® mRNA Direct™ Kit (Invitrogen) with the Mini
146 configuration followed by alkaline hydrolysis. mRNAs were further treated with phosphatase and then
147 with polynucleotide kinase (PNK). 3' and 5' adaptors (Illumina) were ligated and the resulting product
148 was reverse transcribed to generate cDNA by PCR. During PCR amplification, each prepared sample
149 was uniquely indexed (barcoding) using index primer (Illumina) for multiplexing. The PCR products
150 were purified twice with AMPure beads (Agencourt). The quality of the amplified cDNA library was
151 assessed on a Bioanalyzer (Agilent Technologies). Illumina HiSeq 2000 was used for sequencing at
152 the Quantitative Genomics Facility (QGF) at the D-BSSE (Department of Biosystems Science and
153 Engineering) of the ETH Zurich in Basel.

154

155 **Histological studies**

156 After euthanasia by cervical dislocation, Tibilais anterior muscles were collected, freshly frozen
157 in Tissue-Tek (Microm Microtech), and then stored at -80°C. Ten µm sections were stained with
158 hematoxylin-eosin or Sirius Red. For immunostaining the sections were fixed in PBS, 4% PFA at

159 room temperature (RT) 5 min, permeabilized 30 min in PBS, 20% horse serum, 0.1% triton at RT, and
160 incubated with the primary antibody in a solution of PBS, 20% goat serum, 1% BSA, 24h at 4°C.
161 Sections were washed in PBS 3X 10 min and incubated with the secondary antibody in PBS 1 hour at
162 37°C. Sections were washed in PBS, 2X 10 min, incubated 30 seconds with DAPI and washed once in
163 PBS 10min and mounted.

164 For the morphometric analysis, muscle sections were scanned using a NanoZoomer (Hamamatsu
165 Photonics, Japan) with a 20X objective. Definiens developer 7.1. software was used to analyze and
166 quantify the pictures for each entire area.

167

168 **Western blotting**

169 After euthanasia by cervical dislocation, Quadriceps muscle were collected and freshly frozen.
170 Samples were then homogenized for 3×20 s at 4 m.sec⁻¹ in a FastPrep ®-24 (MP-Biomedicals, NY,
171 USA) in lysis buffer (25mM Tris pH7.4, Triton X-100 0.7%, 50mM NaF, 40mM α-Glycero-
172 Phosphate, 10mM Pyrophosphate, 5mM EDTA, 4mM Na₃VO₄, 10mM Hepes, + complete cocktail
173 protease inhibitors + Pierce phosphatase inhibitors tablet). The protein concentrations within each
174 lysate were determined by the Bradford protein assay (Bio-Rad). 40μg of muscle extracts were loaded
175 and separated by SDS. After transfert to polyvinylidene difluoride membranes, reversible Ponceau
176 staining of protein blots to track the total protein level in the blot lanes were performed. The
177 membranes were washed, blocked with 5% nonfat milk and incubated in primary antibody overnight
178 at 4°C. The membranes were then washed in TBS-Tween (10mM Tris, 140mM NaCl, and 0.2%
179 Tween-20), incubated with the appropriate secondary antibody coupled to horseradish peroxidase, and
180 washed again in TBS-Tween. Bands were visualized using the ECL reagent (Thermo Scientific).
181 Films were scanned and analyzed using Image J software. All data were corrected using Ponceau
182 staining. 6 Samples from the three genotypes of mice were all run together on the same gel, and
183 quantification was done relative to the values of the control group for each genotype.

184

185 **Antibodies**

186 Primary antibodies used include: anti-Pax7 (1/50, mouse monoclonal, DSHB); anti-myf5 (1/100,
187 rabbit polyclonal, Santa Cruz, sc-302); anti-Laminin (1/200, rabbit polyclonal, Sigma L9393); anti-
188 AMPK α (1/500, rabbit polyclonal, Cell Signaling 23A3); anti-Phospho-AMPK α (Thr172) (1/500,
189 rabbit polyclonal, Cell Signaling 40H9); anti-Akt (1/500, rabbit polyclonal, Cell Signaling 9271); anti-
190 Phospho-Akt (Ser473) (1/500, rabbit polyclonal, Cell Signaling 9272); anti-FoxO3a (1/500, rabbit
191 polyclonal, Cell Signaling 2497); anti-Phospho-FoxO3a (Ser318/321) (1/500, rabbit polyclonal, Cell
192 Signaling 9465); anti-ULK1 (1/500, rabbit monoclonal, Cell Signaling 8054); anti-Phospho-ULK1
193 (Ser757) (1/500, rabbit polyclonal, Cell Signaling 6888); anti-PRAS40 (1/1000, rabbit monoclonal,
194 Cell Signaling 2691); anti-Phospho-PRAS40 (1/1000, rabbit polyclonal, Cell Signaling 13175); anti-
195 SQSTM1/p62 (1/1000, rabbit polyclonal, Cell Signaling D5E2); anti-LC3A (1/1000, rabbit polyclonal,
196 Cell Signaling D50G8).

197

198 **Statistical analyses**

199 All results are presented as means \pm sem, or as percentages. Statistical significances of the
200 differences between groups were evaluated with Student's t-test.

RESULTS

201

202 **Effect of p43 on protein synthesis and protein degradation signaling pathways in quadriceps** 203 **muscle**

204 Skeletal muscle mass is determined by the dynamic balance between protein synthesis and
205 degradation. The role of p43 in skeletal muscle was studied using WT, p43 muscle-specific transgenic
206 (p43-Tg), and p43^{-/-} mice. Under basal conditions, as previously described, we found that quadriceps,
207 gastrocnemius or tibialis weights were increased in the absence of p43 and conversely decreased in
208 mice overexpressing p43 when compared to controls (Figure 1A). Next, the role of p43 in skeletal
209 muscle homeostasis was studied at the molecular level in quadriceps extracts harvested in fed state.
210 Akt signaling was evaluated by measuring the phosphorylation of Akt (Ser473) and PRAS40
211 (Thr246). Interestingly, the relative phosphorylation levels of both Akt and PRAS40 were increased
212 p43^{-/-} mice whereas no significant differences were found in p43-Tg (Figure 1B-C). Activation level
213 of AMPK was assessed by phosphorylation at Thr172 which was found to be increased in p43
214 overexpressing mice and unchanged in p43^{-/-} animals when compared to WT (Figure 1B-C). Thus, we
215 further evaluate the autophagy-related signaling by measuring the phosphorylation level of Foxo3a at
216 Ser318-321, which results in nuclear export and inhibition of transcription factor activity (16), and the
217 phosphorylation by MTORC1 of ULK1 at Ser757 which disrupts the interaction between ULK1 and
218 AMPK (17). In p43^{-/-} mice ULK1 and Foxo3a phosphorylation were strongly increased whereas the
219 level phosphorylation of these proteins remained unchanged in p43-Tg mice (Figure 1B-C). These
220 observed changes suggest that the skeletal muscle hypertrophy observed in the absence of p43 is
221 mainly attributed to the activation of the Akt/TOR axis as observed by an increased protein synthesis
222 and decreased protein degradation. In contrast, p43 overexpression induces a stimulation of
223 autophagy.

224 Therefore, the autophagic flux was evaluated by measuring the conversion of LC3-I to LC3-II,
225 through lipidation, and the level of p62 (SQSTM1) protein expression, a binding partner of LC3-II
226 which acts as a selective substrate of autophagy. In fed state, p62 protein was significantly
227 accumulated in p43^{-/-} extracts when compared to WT whereas no significant differences were found
228 in p43-Tg (Figure 2A). LC3-I level was unchanged in the same condition and LC3-II was barely

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

229 detectable (Figure 2B). To stimulate autophagy, mice were starved during a 24h period or/and treated
230 with colchicine, an established inhibitor of microtubule-mediated delivery of autophagosome to
231 lysosome (14, 15). After a starvation period and a colchicine treatment, the amount of p62 detected
232 was increased in all genotype when compare to their respective fed state suggesting that the autophagy
233 process is normally induced in both mouse model (Figure 2C). However, a more pronounced
234 accumulation of p62 was measured in p43-Tg extracts compared to controls both in fasted and
235 fasted/colchicine conditions suggesting a higher autophagic flux in these mice (Figure 2C). In line
236 with this, p43-Tg mice display the highest ratio of LC3-II/LC3-I observed in all genotype after
237 starvation and colchicine injection (Figure 2D). Altogether this results show that inhibition of
238 autophagosome fusion to lysosomes led to a more significant accumulation of LC3-II in p43-Tg
239 muscles compared to all genotype tested, strongly supporting that p43 overexpression activates the
240 autophagy process in skeletal muscle (Figure 2D).

241

242 **Identification of downstream targets of p43 in skeletal muscle**

243 In order to unravel the molecular mechanisms underlying the function of p43 in skeletal muscle, we
244 analyzed the transcriptomes obtained from p43^{-/-}, p43-Tg and wild-type quadriceps (Figure 3A). We
245 used next-generation RNA sequencing (RNA-Seq) to identify 12,451 genes expressed in WT
246 quadriceps muscle, 12,457 and 12,455 respectively in p43^{-/-} and p43-Tg quadriceps (Figure S2A). By
247 using a 2 fold change cut-off, 272 genes were found differentially expressed in p43^{-/-} mice when
248 compared with control mice: 147 upregulated, 125 downregulated (Figure 3B) whereas 356 genes
249 were found differentially expressed in p43-Tg animals (226 upregulated, 130 downregulated (Figure
250 3B). Among these genes, 92 were found differentially expressed in both p43^{-/-} and p43-Tg quadriceps
251 (Figure S2B).

252 Pathway analysis interrogation of the differentially expressed genes (Ingenuity Pathway Analysis)
253 highlights that the mains molecular and cellular functions affected by either the overexpression or the
254 deletion of p43 are similar: *Cell-To-Cell Signaling and Interaction*, *Carbohydrate Metabolism*, *Small*
255 *Molecule Biochemistry*, *Cellular Movement*, and *Molecular Transport* (Figure S3A-B). Comparing the
256 two p43 genotypes, the first molecular and cellular functions affected were *Carbohydrate Metabolism*

257 followed by *Cell Death and Survival*, and *Free Radical Scavenging*, two pathways involving
258 mitochondria (Figure S3C). In addition, the Top toxicity list displayed by the Ingenuity Pathway
259 Analysis indicated that between p43^{-/-} and p43-Tg animals, as expected, the main dysfunction targets
260 the mitochondrial physiology: *Mitochondrial Dysfunction*, *Decreases Respiration of Mitochondria*,
261 *Swelling of Mitochondria*, and *Oxidative Stress* (Figure S3D). We next compared the genes which
262 among the differentially expressed genes are oppositely regulated between p43^{-/-} and p43-Tg mice
263 compared with control mice. We defined as differentially expressed a 33% change at least when
264 compared to control mice and a threshold cut off of two-fold change between p43^{-/-} and p43-Tg
265 transcriptomes. This analysis revealed that 50 genes were differentially expressed: 29 upregulated, 21
266 downregulated (Figure 3C). We further employed Q-PCR to validate the expression profile obtained
267 for 15 genes that were found to be oppositely regulated in our two p43 animal models. It is noteworthy
268 that the pool of RNA used for this validation was isolated from different animals than the one
269 employed for RNA-Seq measurement. 9 out of the 15 selected genes were found to display the same
270 expression profile by both Q-PCR and RNA seq approach (Figure 3D-E). Among these genes, *Gdf11*
271 and *Nmrk2* genes functions in skeletal muscle regeneration or in myogenic differentiation have already
272 been described by others (18-20), whereas a potential involvement of the others genes (*Ldh2*, *Lrtm2*,
273 *Dkk3*, *Myh8*, *Kcnab1*, *Kazald1* and *Col24a1*) in these processes remains to be documented.

274

275 **Modulation of p43 signaling impairs early muscle regeneration**

276 To determine whether p43 can modulate regeneration after acute injury, we injected cardiotoxin
277 (CTX) into the TA muscle of WT, p43^{-/-} and p43-Tg mice. Contralateral and injured tibialis were
278 collected, weighted and analyzed at different time points during regeneration (Figure 4A). Assessment
279 of muscle recovery was evaluated by the ratio between injected versus contralateral tibialis weight.
280 We observed that after injury, and for all genotypes, the tibialis weight ratio was initially decreased
281 (day 4 and day 10), before increasing at 28 days post injection in both WT and p43-Tg whereas this
282 ratio remained low in p43^{-/-} tibialis suggesting an impairment of muscle regeneration (Figure 4B). We
283 next performed Hematoxylin and Eosin staining on tibialis muscle sections. At 4 d.p.i, histological
284 analysis of regenerating muscles from all genotypes showed early regenerating myotubes and

285 numerous mononucleated cells (likely proliferating myoblasts and infiltrating immune cells). At 10
286 d.p.i, regenerating control muscles were already composed of newly formed myofibers with centrally
287 located nuclei, whereas p43^{-/-} muscles contained a higher amount of fibrotic tissue and inflammatory
288 cells, and smaller myofibers. At 28 d.p.i, control muscle had fully regenerated and muscle architecture
289 was restored with normal myofiber, whereas p43^{-/-} muscles presented aberrant myofiber morphology
290 and again, a high amount of fibrotic tissue (Figure 4C). To further record and quantify the differences
291 in the regenerative process between WT, p43^{-/-} and p43-Tg mice, we performed immunostaining for
292 Laminin to visualize the basal lamina at 28 d.p.i. We first observed that p43^{-/-} sections display a
293 higher myofiber density (per field) with abnormal morphologies when compared with controls (Figure
294 5A). When assessing the number of myofiber, their cross-sectional area (CSA) and their size
295 distribution, we found that the total number of myofibers per tibialis muscle was strongly increased in
296 both p43^{-/-} and p43-Tg mice when compared with controls (Figure 5B), whereas their median fiber
297 CSA was strongly decreased in particular in absence of p43 (Figure 5C). Calculation of the number
298 and the CSA of myofiber in uninjured tibialis (Figure S1B-C) showed that regenerated myofibers are
299 increased and smaller in all genotypes. Representation of myofiber size distribution demonstrated that
300 the proportion of small myofibers was drastically increased in p43^{-/-} and p43-Tg mice compared with
301 control mice (Figure 5D-E), whereas the number of myofibers with a higher CSA fall in p43^{-/-} injured
302 tibialis (Figure 5D). Taking in account these observations suggesting that the initial number of satellite
303 cells pool could be different in each genotype, we further quantified the different subpopulations of
304 satellite cells expressing Pax7, with or without Myf5 in basal condition in uninjured tibialis. We found
305 no difference between the genotypes in the density of the Pax7⁺/Myf5⁻ cells whereas the
306 Pax7⁺/Myf5⁺ cells pool is increased in both p43^{-/-} and p43-Tg mice when compared with controls
307 tibialis muscles (Figure 5F-G). Last, Sirius Red staining was performed on injured tibialis at 28 d.p.i
308 and revealed a strong increase of fibrosis in p43^{-/-} mice when compared to control or p43-Tg animals
309 (Figure 5H-I).

310

311 **Modulation of p43 signaling delays muscle regeneration**

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

312 The observation that in p43^{-/-} mice 28 d.p.i, the muscle architecture was abnormal with numerous
313 small and rounded shaped myofibers lead us to hypothesize that the regeneration process might be
314 incomplete rather than deficient in this mice. In order to address this point, we further measure the
315 tibialis muscle characteristics 70 days after CTX injection (Figure 6A). Surprisingly, we found that the
316 weight ratio between the injected and contralateral tibialis was increased for all genotypes, strongly
317 indicating that we observe at late time point after injury (70 dpi), a compensatory growth even in p43-
318 ^{-/-} mice (Figure 6B). Histological analysis achieved by Laminin staining revealed that the architecture
319 of the tibialis muscle was fully restored with normal myofibers for all genotypes even if a small
320 proportion of centrally located nuclei were still present at 70 d.p.i. (Figure 6C). As previously
321 described, we further determined the number of myofiber, their cross-sectional area (CSA) and their
322 distribution. At 70 d.p.i. all genotypes display the same number of myofiber despite a small but
323 significant reduction of the mean fiber area in p43^{-/-} and p43-Tg mice when compared with control
324 mice (Figure 6D-E). Interestingly, the measured values, at 70 dpi and for all genotypes were quite
325 similar to those measured in contralateral tibialis (Figure S1B-C) indicating that at this stage the
326 regenerative process was near to be complete. Analysis of the fiber size distribution demonstrated that
327 the overall pattern was very similar between the genotypes excepting for small myofibers that
328 remained higher in p43^{-/-} and p43-Tg mice when compared with control mice (Figure 6F-G). Notably,
329 Sirius Red staining on injured tibialis at 70 d.p.i was similar for all genotypes indicating a resorption
330 of fibrosis between 28 d.p.i and 70 d.p.i in p43^{-/-} mice (Figure 6H-I). Next, we compared the density
331 of nuclei (number of nuclei by cross section area) and the fusion index (number of nuclei by fiber)
332 between the injected and contralateral tibialis (Figure 7A-C). Uninjured tibialis display no significant
333 differences between WT and p43-Tg animals whereas the density of nuclei and the fusion index were
334 decreased when measured in p43^{-/-} muscle (Figure 7B). At 70 d.p.i, the density of nuclei and the
335 fusion index in the tibialis muscle were found increased for all genotypes compared to contralateral
336 muscle (Figure 7C).

338

DISCUSSION

1
2 339 Taking advantage of our genetic models we investigated here the role of p43 in skeletal muscle
3
4 340 homeostasis in physiological condition and in response to muscle injury. We have previously shown
5
6 341 that the absence of p43 leads to an increase of muscle mass (11) whereas its overexpression induces
7
8 342 muscle atrophy during aging (12). However, the function of p43 on the balance between protein
9
10 343 synthesis and degradation remained partly unclear. Using quadriceps muscle extracts in fed state we
11
12 344 reported that Akt/mTOR signaling, which plays a critical role in promoting protein synthesis in
13
14 345 skeletal muscle, is increased in absence of p43. The observed inhibition of the ULK1 and Foxo3a
15
16 346 pathways clearly suggested that the autophagy signaling is reduced in p43^{-/-} mice. In contrast, p43
17
18 347 overexpression leads to an activation of AMPK, a known positive regulator of Ulk1 in the promotion
19
20 348 of autophagy pathway (21). Of note, the protein synthesis pathway was not to found to be affected by
21
22 349 the overexpression of the receptor. Autophagy is a nonspecific degradation process highly dynamic
23
24 350 and regulated. Therefore, autophagic flux was evaluated by both the conversion of LC3-I to LC3-II
25
26 351 and p62 expression level (22). In fed state, the levels of p62 were significantly elevated in p43^{-/-}
27
28 352 extracts when compared to WT whereas conversion of LC3-I to LC3-II was barely detectable. This
29
30 353 accumulation of p62 level suggests a blockade of autophagy (23). In a next step, to stimulate
31
32 354 autophagy, mice were starved during a 24h period or/and treated with colchicine, an established
33
34 355 inhibitor of microtubule-mediated delivery of autophagosome to lysosome (14, 15). After a starvation
35
36 356 period and a colchicine treatment we found that p62 level increase in p43-Tg extracts compared to fed
37
38 357 state and WT. This observation also indicates that p62 level does not always inversely correlate with
39
40 358 autophagic activity. Our results showing that the starvation and the inhibition of autophagosome
41
42 359 fusion to lysosomes led to a more significant accumulation of LC3-II in p43-Tg muscles compared to
43
44 360 controls, indicate that p43 overexpression increases autophagic flux in these conditions. In contrast,
45
46 361 we found no difference in the LC3-II/LC3-I ratio between WT and p43^{-/-} muscle extracts whereas an
47
48 362 inhibition of autophagy in the absence of p43 could have been expected. However, because p43^{-/-}
49
50 363 mice are leaner and hypermetabolic (24, 25) we could postulate that skeletal muscle wasting began
51
52 364 earlier in these mice which may explains why we did not observe an inhibition of the autophagy flux
53
54 365 in p43^{-/-} mice when compared to control animals. These findings in the light of our previous study
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

338

DISCUSSION

1
2 339 Taking advantage of our genetic models we investigated here the role of p43 in skeletal muscle
3
4 340 homeostasis in physiological condition and in response to muscle injury. We have previously shown
5
6 341 that the absence of p43 leads to an increase of muscle mass (11) whereas its overexpression induces
7
8 342 muscle atrophy during aging (12). However, the function of p43 on the balance between protein
9
10 343 synthesis and degradation remained partly unclear. Using quadriceps muscle extracts in fed state we
11
12 344 reported that Akt/mTOR signaling, which plays a critical role in promoting protein synthesis in
13
14 345 skeletal muscle, is increased in absence of p43. The observed inhibition of the ULK1 and Foxo3a
15
16 346 pathways clearly suggested that the autophagy signaling is reduced in p43^{-/-} mice. In contrast, p43
17
18 347 overexpression leads to an activation of AMPK, a known positive regulator of Ulk1 in the promotion
19
20 348 of autophagy pathway (21). Of note, the protein synthesis pathway was not to found to be affected by
21
22 349 the overexpression of the receptor. Autophagy is a nonspecific degradation process highly dynamic
23
24 350 and regulated. Therefore, autophagic flux was evaluated by both the conversion of LC3-I to LC3-II
25
26 351 and p62 expression level (22). In fed state, the levels of p62 were significantly elevated in p43^{-/-}
27
28 352 extracts when compared to WT whereas conversion of LC3-I to LC3-II was barely detectable. This
29
30 353 accumulation of p62 level suggests a blockade of autophagy (23). In a next step, to stimulate
31
32 354 autophagy, mice were starved during a 24h period or/and treated with colchicine, an established
33
34 355 inhibitor of microtubule-mediated delivery of autophagosome to lysosome (14, 15). After a starvation
35
36 356 period and a colchicine treatment we found that p62 level increase in p43-Tg extracts compared to fed
37
38 357 state and WT. This observation also indicates that p62 level does not always inversely correlate with
39
40 358 autophagic activity. Our results showing that the starvation and the inhibition of autophagosome
41
42 359 fusion to lysosomes led to a more significant accumulation of LC3-II in p43-Tg muscles compared to
43
44 360 controls, indicate that p43 overexpression increases autophagic flux in these conditions. In contrast,
45
46 361 we found no difference in the LC3-II/LC3-I ratio between WT and p43^{-/-} muscle extracts whereas an
47
48 362 inhibition of autophagy in the absence of p43 could have been expected. However, because p43^{-/-}
49
50 363 mice are leaner and hypermetabolic (24, 25) we could postulate that skeletal muscle wasting began
51
52 364 earlier in these mice which may explains why we did not observe an inhibition of the autophagy flux
53
54 365 in p43^{-/-} mice when compared to control animals. These findings in the light of our previous study
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 366 showing that p43 overexpression induces both Atrogin-1/MAFbx and MuRF1 muscle specific E3
2 367 ligases (12) demonstrates that increased level of p43 induces skeletal muscle atrophy by stimulating
3
4 368 both autophagy and the ubiquitin proteasome pathway. Altogether, these results strongly suggest that
5
6 369 the observed skeletal muscle hypertrophy consecutive to p43 loss is mainly attributed to the activation
7
8 370 of protein synthesis and the decreased protein degradation, whereas the induction of autophagy mainly
9
10 371 explained the skeletal muscle atrophy induced by the overexpression of p43. Thus, our study reveals
11
12 372 that autophagy, a key process in skeletal muscle homeostasis, is the main pathway affected upon p43
13
14 373 accumulation. Among the factors and signaling pathways known to contribute to the regulation of the
15
16 374 autophagic flux, reactive oxygen species (ROS) have a central role (26). While a number of potential
17
18 375 sources of ROS production exists in skeletal muscle, mitochondria have been proposed as the main
19
20 376 source of ROS for induction of autophagy (27). Ultimately, the fact that p43 has been demonstrated to
21
22 377 regulate mitochondrial activity (4-6) and ROS production (12, 28), strongly support the notion that this
23
24 378 receptor is a regulator of autophagy in skeletal muscle (Figure 8).

25
26
27
28
29 379 Upon injury to the muscle tissue, the skeletal muscle stem cells which are normally quiescent are
30
31 380 activated. Once activated, satellite cells start to proliferate, migrate to the site of injury and
32
33 381 subsequently differentiate and fuse to form newly multinucleated fibers to repair and rebuild the
34
35 382 damaged myofibers (29). Here we show that the p43 signaling pathway is required for satellite cells
36
37 383 during skeletal muscle regeneration. We found that in mice, overexpression and/or deletion of p43
38
39 384 both affects muscle regeneration following acute injury. In absence of p43, muscle satellite cells
40
41 385 differentiate less efficiently inducing a marked delay in muscle regeneration whereas overexpression
42
43 386 of p43 pushed satellite cells prematurely toward differentiation.

44
45
46 387 Recently, the role of TH (30, 31) and TRs (32) have been investigated in the context of injury
47
48 388 induced muscle regeneration. Notably, satellite cell-specific deletion of the 5-deiodinase 3 gene (D3),
49
50 389 the enzyme that inactivates T3, severely impairs skeletal muscle regeneration (16). Similarly in mice,
51
52 390 the introduction of a dominant-negative knock-in mutation in the TR α gene (TR α 1PV) results in an
53
54 391 impairment of skeletal muscle regeneration whereas a similar mutation in TR β gene (TR β 1PV) has no
55
56 392 effect (32). To conclude these authors speculated that the local control of T3 and TR α plays an
57
58 393 essential role during *in vivo* skeletal muscle regeneration. These studies strongly suggest that TR α gene

394 mediates the effects of T3 during skeletal muscle regeneration. Our findings provide evidence that
1
2 395 p43, a truncated form of the nuclear receptor TR α 1, mediates in part the influence of T3 during muscle
3
4 396 tissue repair after acute injury. In addition, we bring evidence that p43 ensures the proper duration of
5
6 397 skeletal muscle regeneration. However, its absence does not compromise the programs required for
7
8 398 satellite cell lineage progression and skeletal muscle regeneration. These differences may be attributed
9
10 399 to the different time point we selected for the post-injury analysis; only 14 days after cardiotoxin
11
12 400 injection for the study of Milanesi (32) and co-workers; 40 days in the report addressing the role of the
13
14 401 D3 gene (16); whereas we found that 70 days post-injury were necessary to obtain an almost complete
15
16 402 regeneration in absence of p43.
17

18
19 403 Because skeletal muscle maintenance in adult and/or after injury rely on the number of satellite
20
21 404 cells found in initial pool, we quantified in tibialis muscle the subpopulations of resident satellite cells
22
23 405 expressing Pax7, with or without Myf5. Pax7+/Myf5- cells are destined for self-renewal whereas
24
25 406 Pax7+/Myf5+ cells are committed satellite cells which can ensure fiber growth and repair.
26
27 407 Interestingly, we observed that only the Pax7+/Myf5+ cells pool is increased in both p43^{-/-} and p43⁻
28
29 408 Tg mice when compared with controls tibialis muscles. Such an increase in absence of p43 is
30
31 409 surprising and contradictory to the observation that satellite cells are strongly reduced in TR α 1PV
32
33 410 mice tibialis (32). However, taking in account our previous results showing that reduction of
34
35 411 mitochondrial activity severely decreased myoblast proliferation (21-22, 36), we could postulate that
36
37 412 this increase of satellite cells pool is more likely an adaptive response to ensure skeletal muscle
38
39 413 maintenance during adult life in p43^{-/-} mice.
40
41
42
43

44 414 In this study we observed that 28 days after acute injury, muscle regeneration is affected by the
45
46 415 absence of p43 as attested by the decreased tibialis muscle weight we recorded. In addition, despite the
47
48 416 histological analysis indicates a strong increase in the number of myofibers, their size remains very
49
50 417 small and their morphology abnormal when compared to WT tibialis. In p43^{-/-} mice, 70 days are
51
52 418 required to fully recover skeletal muscle similar to that of control animals. On another hand, at 28 days
53
54 419 after acute injury, the tibialis muscle weight of mice overexpressing of p43 is already similar to the
55
56 420 contralateral tibialis muscle. In addition, histological analysis indicates a strong increase in the number
57
58 421 of small myofibers whereas the distribution of big fibers did not change. Here again, 70 days were
59
60
61
62
63
64
65

1
2 422 required to fully recover skeletal muscle. We have previously shown that in avian and/or murine
3
4 423 myoblasts, p43 overexpression stimulates mitochondrial activity, cell proliferation and potentiates
5
6 424 terminal differentiation, whereas direct inhibition of this pathway induces the reverse changes (21-23).
7
8 425 Furthermore, we established that this phenotype is mediated through the regulation of the expression
9
10 426 of the cellular oncogene c-Myc, which controls irreversible myoblasts withdrawal from the cell cycle
11 427 (7). Altogether these observations strongly support that an alteration of mitochondrial activity
12
13 428 interferes with the ability of myogenic factors to induce terminal differentiation. Here we report that
14
15 429 p43 deficiency leads to a marked delay of muscle regeneration, we hypothesize that p43^{-/-} satellite
16
17 430 cells proliferate and differentiate less efficiently when compared to WT cells, leading to an increased
18
19 431 duration of the proliferation period and a delayed muscle regeneration. Conversely, p43
20
21 432 overexpression stimulates proliferation and pushes prematurely the satellite cells toward
22
23 433 differentiation. However, this precocious induction of terminal myoblast differentiation induced by
24
25 434 p43 is to the detriment of an optimal myoblast proliferation period (Figure 9).

26
27
28
29 435 Acute muscle injury frequently results in muscle fibrosis which corresponds to a deposition of
30
31 436 collagen and other extracellular matrix proteins produced by muscle fibroblasts but also by
32
33 437 fibro/adipogenic progenitors and skeletal muscle progenitors. The interaction between satellite cells
34
35 438 and these cells from the connective tissue is necessary to produce increased levels of extracellular
36
37 439 matrix components to ensure an efficient and effective muscle repair. However, in normal case these
38
39 440 extracellular matrix components are degraded as regeneration and growth of new myofibers proceeds
40
41 441 whereas in abnormal muscle repair, the maintenance of fibrosis represents a common pathway for
42
43 442 numerous muscular diseases. In p43^{-/-} mice we observed an increase of fibrosis 28 days after
44
45 443 cardiotoxin injection which is no longer present at 70 days. These data suggest clearly that the
46
47 444 accumulation of extracellular matrix components at 28 days post injury is reminiscent from the
48
49 445 marked delay in muscle regeneration in this mouse model rather than being pathologic.

50
51
52
53 446 Finally, the transcriptomic analysis performed by next-generation sequencing allowed us to identify
54
55 447 the downstream effectors affected by p43 manipulation in mouse skeletal muscle. We focused our
56
57 448 analysis on p43 signaling to improve our knowledge linking p43, mitochondrial activity and skeletal
58
59 449 muscle growth and maintenance. 272 and 356 genes were found to be differentially expressed (>2

1 450 fold) when compared with controls respectively in quadriceps devoid of p43 or overexpressing this
2 451 receptor. A software based analysis (Ingenuity Pathway Analysis) of the differentially expressed genes
3
4 452 unraveled that the five main molecular and cellular functions affected by either the overexpression or
5
6 453 the deletion of p43 are the same. Comparison of genes oppositely regulated between p43^{-/-} and p43-
7
8 454 Tg mice revealed interesting new target of p43. Among these genes, *Gdf11* was recently reported to
9
10 455 restore regenerative function in aged mice and to be considered as such as a rejuvenating factor for
11 456 skeletal muscle (Sinha, Jang et al. 2014). However, this study was more recently contradicted by
12
13 457 several reports (19, 33) which unravel the detrimental effects of circulating GDF11 levels in aged mice
14
15 458 (34). In this context, the physiological effect of GDF11 on muscle tissue remains to be elucidated. The
16
17 459 finding that *Nmrk2* is a target of p43 is interesting because this protein, formerly called MIBP, has
18
19 460 been previously described to block the fusion and terminal differentiation in C2C12 myoblasts (20).
20
21 461 The observation that the expression of *Nmrk2* is increased in absence of p43 and decreased in case of
22
23 462 p43 overexpression is an additional element to satisfactorily explain why in the absence of p43 the
24
25 463 satellite cells differentiate less efficiently after injury and conversely why overexpression of p43
26
27 464 prematurely engages satellite cells toward differentiation.

28
29 465 In summary, we found that p43 is a regulator of autophagy in skeletal muscle. In addition, we
30
31 466 demonstrated that p43 plays an important role *in vivo* by controlling the duration of skeletal muscle
32
33 467 regeneration after acute injury. Our findings indicate that after injury, p43 signaling, through the
34
35 468 regulation of mitochondrial activity, plays an essential role in proliferation and differentiation of
36
37 469 myoblasts mainly via the control of cell cycle withdrawal. Our findings represent a significant advance
38
39 470 in our understanding of satellite cells biology and muscle regeneration, and establish that a tight
40
41 471 control of endogenous p43 in SCs is required for their function within the skeletal muscle tissue. In
42
43 472 addition, our data provide evidence that p43 mediates in part the influence of thyroid hormone during
44
45 473 muscle tissue repair after acute injury. Our results open new perspectives for the development of
46
47 474 therapeutics strategies based on the local control of p43 *in vivo* or to stimulate locally the
48
49 475 mitochondrial activity in order to ameliorate disorders associated with impaired adult myogenesis
50
51 476 occurring during ageing.

52
53
54
55
56
57
58
59
60 477

478

ACKNOWLEDGEMENT

1
2 479 We thank the animal staff for animal care. We are thankful to the member of the Quantitative
3
4 480 Genomic Facility (Basel,CH) for the sequencing of the RNA library generated in the study. We are
5
6 481 also thankful for the support and generosity of Pr M Ruegg and Pr M. Zavolane at the Biozentrum
7
8 482 (Basel, CH). The authors certify that they comply with the ethical guidelines for publishing in the
9
10 483 Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle: update 2015.
11
12

13 484

COMPETING INTERESTS

15 485

17 486 The authors declare that they have no competing interests.
18
19

20 487

FUNDING

22 488

24 489 This work was supported by the National Institute for Agronomic Research (INRA) and by AFM-
25
26 490 Téléthon.
27
28

29 491

AUTHOR CONTRIBUTIONS

31 492

33 493 F. Casas and L. Tintignac designed research and wrote the paper. F. Casas, L. Tintignac, L.
34
35 494 Pessemesse, E. Blanchet, F. Cortade, E. Jublanc, R. Demangel, G. Py, C. Sar, M. Kaiser and N. Mittal
36
37 495 performed research and analyzed data. C. Wrutniak-Cabello and G. Cabello analyzed data.
38
39

40 496
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

- 1
2 498 1. Sugie H, Verity MA. Postnatal histochemical fiber type differentiation in normal and
3
4
5 499 hypothyroid rat soleus muscle. *Muscle Nerve*. 1985 Oct;8(8):654-60.
6
- 7 500 2. King DB, Bair WE, Jacaruso RB. Thyroidal influence on nuclear accumulation and DNA
8
9 501 replication in skeletal muscles of young chickens. *J Exp Zool Suppl*. 1987;1:291-8.
10
- 11 502 3. Izumo S, Nadal-Ginard B, Mahdavi V. All members of the MHC multigene family respond to
12
13 503 thyroid hormone in a highly tissue-specific manner. *Science*. 1986 Feb 7;231(4738):597-600.
14
- 15 504 4. Wrutniak C, Cassar-Malek I, Marchal S, Rasclé A, Heusser S, Keller JM, et al. A 43-kDa
16
17 505 protein related to c-Erb A alpha 1 is located in the mitochondrial matrix of rat liver. *J Biol Chem*.
18
19 506 1995;270:16347-54.
20
- 21 507 5. Wrutniak-Cabello C, Casas F, Cabello G. Thyroid hormone action in mitochondria. *J Mol*
22
23 508 *Endocrinol*. 2001 Feb;26(1):67-77.
24
- 25 509 6. Casas F, Rochard P, Rodier A, Cassar-Malek I, Marchal-Victorion S, Wiesner RJ, et al. A
26
27 510 variant form of the nuclear triiodothyronine receptor c-ErbAalpha1 plays a direct role in regulation of
28
29 511 mitochondrial RNA synthesis. *Mol Cell Biol*. 1999 Dec;19(12):7913-24.
30
31
- 32 512 7. Rochard P, Rodier A, Casas F, Cassar-Malek I, Marchal-Victorion S, Daury L, et al.
33
34 513 Mitochondrial activity is involved in the regulation of myoblast differentiation through myogenin
35
36 514 expression and activity of myogenic factors. *J Biol Chem*. 2000 Jan 28;275(4):2733-44.
37
38
- 39 515 8. Seyer P, Grandemange S, Busson M, Carazo A, Gamaleri F, Pessemesse L, et al.
40
41 516 Mitochondrial activity regulates myoblast differentiation by control of c-Myc expression. *J Cell*
42
43 517 *Physiol*. 2006 Apr;207(1):75-86.
44
- 45 518 9. Seyer P, Grandemange S, Rochard P, Busson M, Pessemesse L, Casas F, et al. P43-dependent
46
47 519 mitochondrial activity regulates myoblast differentiation and slow myosin isoform expression by
48
49 520 control of Calcineurin expression. *Exp Cell Res*. 2011 Aug 15;317(14):2059-71.
50
51
- 52 521 10. Casas F, Pessemesse L, Grandemange S, Seyer P, Gueguen N, Baris O, et al. Overexpression
53
54 522 of the mitochondrial T3 receptor p43 induces a shift in skeletal muscle fiber types. *PLoS ONE*.
55
56 523 2008;3(6):e2501.
57
58
59
60
61
62
63
64
65

524 11. Pessemesse L, Schlernitzauer A, Sar C, Levin J, Grandemange S, Seyer P, et al. Depletion of
1 the p43 mitochondrial T3 receptor in mice affects skeletal muscle development and activity. *Faseb J.*
2 525
3
4 526 2012 Feb;26(2):748-56.
5
6 527 12. Casas F, Pessemesse L, Grandemange S, Seyer P, Baris O, Gueguen N, et al. Overexpression
7
8 528 of the mitochondrial T3 receptor induces skeletal muscle atrophy during aging. *PLoS ONE.*
9
10 529 2009;4(5):e5631.
11
12
13 530 13. Blanchet E, Bertrand C, Annicotte JS, Schlernitzauer A, Pessemesse L, Levin J, et al.
14
15 531 Mitochondrial T3 receptor p43 regulates insulin secretion and glucose homeostasis. *Faseb J.* 2012
16
17 532 Jan;26(1):40-50.
18
19 533 14. Ju JS, Varadhachary AS, Miller SE, Wehl CC. Quantitation of "autophagic flux" in mature
20
21 534 skeletal muscle. *Autophagy.* 2010 Oct;6(7):929-35.
22
23
24 535 15. Milan G, Romanello V, Pescatore F, Armani A, Paik JH, Frasson L, et al. Regulation of
25
26 536 autophagy and the ubiquitin-proteasome system by the FoxO transcriptional network during muscle
27
28 537 atrophy. *Nat Commun.* 2015 Apr 10;6:6670.
29
30
31 538 16. Arden KC. FoxO: linking new signaling pathways. *Mol Cell.* 2004 May 21;14(4):416-8.
32
33 539 17. Kim J, Kundu M, Viollet B, Guan KL. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct
34
35 540 phosphorylation of Ulk1. *Nat Cell Biol.* 2011 Feb;13(2):132-41.
36
37
38 541 18. Sinha M, Jang YC, Oh J, Khong D, Wu EY, Manohar R, et al. Restoring systemic GDF11
39
40 542 levels reverses age-related dysfunction in mouse skeletal muscle. *Science.* 2014 May
41
42 543 9;344(6184):649-52.
43
44 544 19. Egerman MA, Cadena SM, Gilbert JA, Meyer A, Nelson HN, Swalley SE, et al. GDF11
45
46 545 Increases with Age and Inhibits Skeletal Muscle Regeneration. *Cell Metab.* 2015 Jul 7;22(1):164-74.
47
48
49 546 20. Li J, Mayne R, Wu C. A novel muscle-specific beta 1 integrin binding protein (MIBP) that
50
51 547 modulates myogenic differentiation. *J Cell Biol.* 1999 Dec 27;147(7):1391-8.
52
53 548 21. Russell RC, Yuan HX, Guan KL. Autophagy regulation by nutrient signaling. *Cell Res.* 2014
54
55 549 Jan;24(1):42-57.
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 550 22. Bjorkoy G, Lamark T, Brech A, Outzen H, Perander M, Overvatn A, et al. p62/SQSTM1
2 551 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell
3
4 552 death. *J Cell Biol.* 2005 Nov 21;171(4):603-14.
5
6 553 23. Mizushima N, Yoshimori T. How to interpret LC3 immunoblotting. *Autophagy.* 2007 Nov-
7
8 554 Dec;3(6):542-5.
9
10 555 24. Bertrand C, Blanchet E, Pessemesse L, Annicotte JS, Feillet-Coudray C, Chabi B, et al. Mice
11 556 lacking the p43 mitochondrial T3 receptor become glucose intolerant and insulin resistant during
12
13 557 aging. *PLoS ONE.* 2013;8(9):e75111.
14
15 558 25. Bertrand-Gaday C, Pessemesse L, Cabello G, Wrutniak-Cabello C, Casas F. Temperature
16 559 homeostasis in mice lacking the p43 mitochondrial T3 receptor. *FEBS Lett.* 2016 Apr;590(7):982-91.
17
18 560 26. Rodney GG, Pal R, Abo-Zahrah R. Redox regulation of autophagy in skeletal muscle. *Free*
19 561 *Radic Biol Med.* 2016 Sep;98:103-12.
20
21 562 27. Barbieri E, Sestili P. Reactive oxygen species in skeletal muscle signaling. *J Signal Transduct.*
22 563 2012;2012:982794.
23
24 564 28. Grandemange S, Seyer P, Carazo A, Becuwe P, Pessemesse L, Busson M, et al. Stimulation of
25 565 mitochondrial activity by p43 overexpression induces human dermal fibroblast transformation. *Cancer*
26 566 *Res.* 2005 May 15;65(10):4282-91.
27
28 567 29. Brack AS, Rando TA. Tissue-specific stem cells: lessons from the skeletal muscle satellite
29 568 cell. *Cell Stem Cell.* 2012 May 4;10(5):504-14.
30
31 569 30. Dentice M, Ambrosio R, Damiano V, Sibilio A, Luongo C, Guardiola O, et al. Intracellular
32 570 inactivation of thyroid hormone is a survival mechanism for muscle stem cell proliferation and lineage
33 571 progression. *Cell Metab.* 2014 Dec 2;20(6):1038-48.
34
35 572 31. Dentice M, Marsili A, Ambrosio R, Guardiola O, Sibilio A, Paik JH, et al. The FoxO3/type 2
36 573 deiodinase pathway is required for normal mouse myogenesis and muscle regeneration. *J Clin Invest.*
37 574 2010 Nov;120(11):4021-30.
38
39 575 32. Milanese A, Lee JW, Kim NH, Liu YY, Yang A, Sedrakyan S, et al. Thyroid Hormone
40 576 Receptor alpha Plays an Essential Role in Male Skeletal Muscle Myoblast Proliferation,
41 577 Differentiation, and Response to Injury. *Endocrinology.* 2016 Jan;157(1):4-15.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

578 33. Rodgers BD, Eldridge JA. Reduced Circulating GDF11 Is Unlikely Responsible for Age-
579 Dependent Changes in Mouse Heart, Muscle, and Brain. *Endocrinology*. 2015 Nov;156(11):3885-8.
580 34. Rinaldi F, Zhang Y, Mondragon-Gonzalez R, Harvey J, Perlingeiro RC. Treatment with
581 rGDF11 does not improve the dystrophic muscle pathology of mdx mice. *Skelet Muscle*. 2016;6:21.

582

583

FIGURE LEGENDS

1

2 584

3

4 585 **Figure 1.** Effect of p43 on protein synthesis and protein degradation signaling pathways in

5

6 586 quadriceps muscle.

7

8 587 (A) Muscle weights in wild-type, p43^{-/-} and p43-Tg mice at 6 months of age.

9

10 588 (B) Western-blot analysis of the indicated proteins were performed using quadriceps muscle lysates

11

12 589 extracted from fed wild-type, p43^{-/-} and p43-Tg mice at 6 months of age (n=6 for each group).

13

14 590 Western-blots are representative of data obtained.

15

16 591 (C) Quantification of the western-blot (B) by Image J after normalization by red Ponceau. Statistical

17

18 592 Significance: *p<0.05; ***p<0.001, Student's *t*-test. Results are expressed as ±sem.

19

20 593

21

22 594 **Figure 2.** Influence of p43 signaling on autophagic flux.

23

24 595 (A-D) Western-blot analysis of p62 and LC3 were performed using quadriceps muscle lysates

25

26 596 extracted from wild-type, p43^{-/-} and p43-Tg mice at 6 months of age. Western-blot are representative

27

28 597 of data obtained. Western-blots were quantified by Image J after normalization by red Ponceau.

29

30 598 (A-B) Western-blot analysis of p62 and LC3 in homogenates of quadriceps muscles from fed animals.

31

32 599 (C-D) Western-blot analysis of p62 and LC3 in homogenates of quadriceps muscles from fed and

33

34 600 starved (24h) animals treated or not with colchicine.

35

36 601 Significance: *p<0.05; **p<0.01, Student's *t*-test. Results are expressed as ±sem.

37

38 602

39

40 603 **Figure 3.** Identification of downstream targets of p43 in skeletal muscle.

41

42 604 (A) The transcriptomes of quadriceps muscle from p43^{-/-}, p43-Tg and wild-type mice were compared

43

44 605 by next-generation RNA sequencing (RNA-Seq).

45

46 606 (B) Comparison of genes differentially expressed in quadriceps from p43^{-/-} or in p43-Tg mice

47

48 607 compared with control mice. A threshold of two-fold change in expression was applied.

49

50 608 (C) Comparison of genes differentially expressed between quadriceps from p43^{-/-} and p43-Tg mice.

51

52 609 We defined as differentially expressed a 33% change at least compared with control mice value and a

53

54 610 threshold of two-fold change in expression was applied.

55

56

57

58

59

60

61

62

63

64

65

611 (D) List of the 50 genes differentially expressed between quadriceps from p43^{-/-} and p43-Tg mice.

612 Expression levels of up-regulated and down-regulated genes are represented in green or red colors,
613 respectively.

614 (E) Custom gene-set analysis of 15 genes differentially expressed between quadriceps from p43^{-/-} and
615 p43-Tg mice. Expression levels of up-regulated and down-regulated genes are represented in green or
616 red colors, respectively.

617 (F) Validation by Q-PCR of the 15 genes found to be differentially expressed between quadriceps
618 from p43^{-/-} and p43-Tg mice.

619 Statistical Significance: *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001, Student's *t*-test. Results are expressed as
620 ±sem.

621

622 **Figure 4.** Modulation of p43 signaling impairs early muscle regeneration at 28 days post injury.

623 (A) Experimental setup. Tibialis muscle were injured by a single CTX injection and analyzed at
624 different times following injury.

625 (B) Assessment of muscle recovery evaluated by the ratio between the injected and contralateral
626 tibialis weight analyzed at different times following injury.

627 (C) H&E staining on cryosections of uninjured and regenerating muscle tissue at 4, 10 and 28 d.p.i in
628 wild-type, p43^{-/-} and p43-Tg mice.

629 Significance: ***p<0.001, Student's *t*-test. Results are expressed as ±sem.

630

631 **Figure 5.** Influence of the modulation of p43 signaling on muscle characteristics at 28 days post
632 injury.

633 (A) Anti-Laminin staining on cryosections of regenerated Tibialis muscles in wild-type, p43^{-/-} and
634 p43-Tg mice at 28 d.p.i.

635 (B) Total fibers number in wild-type, p43^{-/-} and p43-Tg mice at 28 d.p.i.

636 (C) Mean fibers area in wild-type, p43^{-/-} and p43-Tg mice at 28 d.p.i.

637 (D) Fiber size distribution in wild-type and p43^{-/-} mice at 28 d.p.i.

638 (E) Fiber size distribution in wild-type and p43-Tg mice at 28 d.p.i.

639 (F) Example of Anti-myf5, Anti-Pax7, Dapi and merge staining on cryosections of Tibialis muscles
1
2 640 performed in wild-type, p43^{-/-} and p43-Tg mice. Arrows indicate the nuclei stained by
3
4 641 immunolabeling.
5
6 642 (G) Quantification of the Pax7⁺/Myf5⁻ and Pax7⁺/Myf5⁺ cells density based on staining in (F) in
7
8 643 wild-type, p43^{-/-} and p43-Tg mice.
9
10 644 (H) Sirius Red staining on cryosections of regenerated Tibialis muscles in wild-type, p43^{-/-} and p43-
11
12 Tg mice at 28 d.p.i.
13 645
14
15 646 (I) Quantification of Sirius Red staining (H) muscles in wild-type, p43^{-/-} and p43-Tg mice at 28 d.p.i.
16
17 647 Statistical Significance: *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001. Results are expressed as ±sem.
18
19
20 648

21
22 649 **Figure 6.** Modulation of p43 signaling delays muscle regeneration.

23
24 650 (A) Experimental setup. Tibialis muscle were injured by a single CTX injection and analyzed at
25
26 651 different times following injury.
27
28 652 (B) Assessment of muscle recovery evaluated by the ratio between the injected and contralateral
29
30 tibialis weight analyzed at different times following injury.
31 653
32
33 654 (C) Anti-Laminin staining on cryosections of regenerated Tibialis muscles in wild-type, p43^{-/-} and
34
35 p43-Tg mice at 70 d.p.i.
36 655
37
38 656 (D) Total fibers number in wild-type, p43^{-/-} and p43-Tg mice at 70 d.p.i.
39
40 657 (E) Mean fibers area in wild-type, p43^{-/-} and p43-Tg mice at 70 d.p.i.
41
42 658 (F) Fiber size distribution in wild-type and p43^{-/-} mice at 70 d.p.i.
43
44 659 (G) Fiber size distribution in wild-type and p43-Tg mice at 70 d.p.i.
45
46 660 (H) Sirius Red staining on cryosections of regenerated Tibialis muscles in wild-type, p43^{-/-} and p43-
47
48 Tg mice at 70 d.p.i.
49 661
50
51 662 (I) Quantification of Sirius Red staining (H) muscles in wild-type, p43^{-/-} and p43-Tg mice at 70 d.p.i.
52
53 663 Statistical Significance: *p < 0.05, **p < 0.01. Results are expressed as ±sem.
54
55
56 664

57
58 665 **Figure 7.** Measurement of muscle characteristics after injection of Cardiotoxin.
59
60
61
62
63
64
65

666 (A) Anti-Laminin staining on cryosections of contralateral tibialis and regenerated Tibialis muscles at
1
2 667 28 and 70 d.p.i in wild-type, p43^{-/-} and p43-Tg mice.
3
4 668 (B) Relative density of nuclei in contralateral tibialis or after injection of Cardiotoxin in wild-type,
5
6 669 p43^{-/-} and p43-Tg mice.
7
8
9 670 (C) Relative fusion index in contralateral tibialis or after injection of Cardiotoxin in wild-type, p43^{-/-}
10
11 671 and p43-Tg mice.
12
13 672 Statistical Significance: *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001, Student's *t*-test. Results are expressed as
14
15 673 ±sem.
16
17 674
18
19 675 **Figure 8.** Schematic representation of p43 influence on protein synthesis and protein degradation
20
21 676 signaling pathways in quadriceps muscle.
22
23
24 677
25
26 678 **Figure 9.** Schematic representation of p43 influence during skeletal muscle regeneration
27
28
29 679
30
31 680 **Table 1.** Primers.
32
33 681
34
35 682
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Figure 1

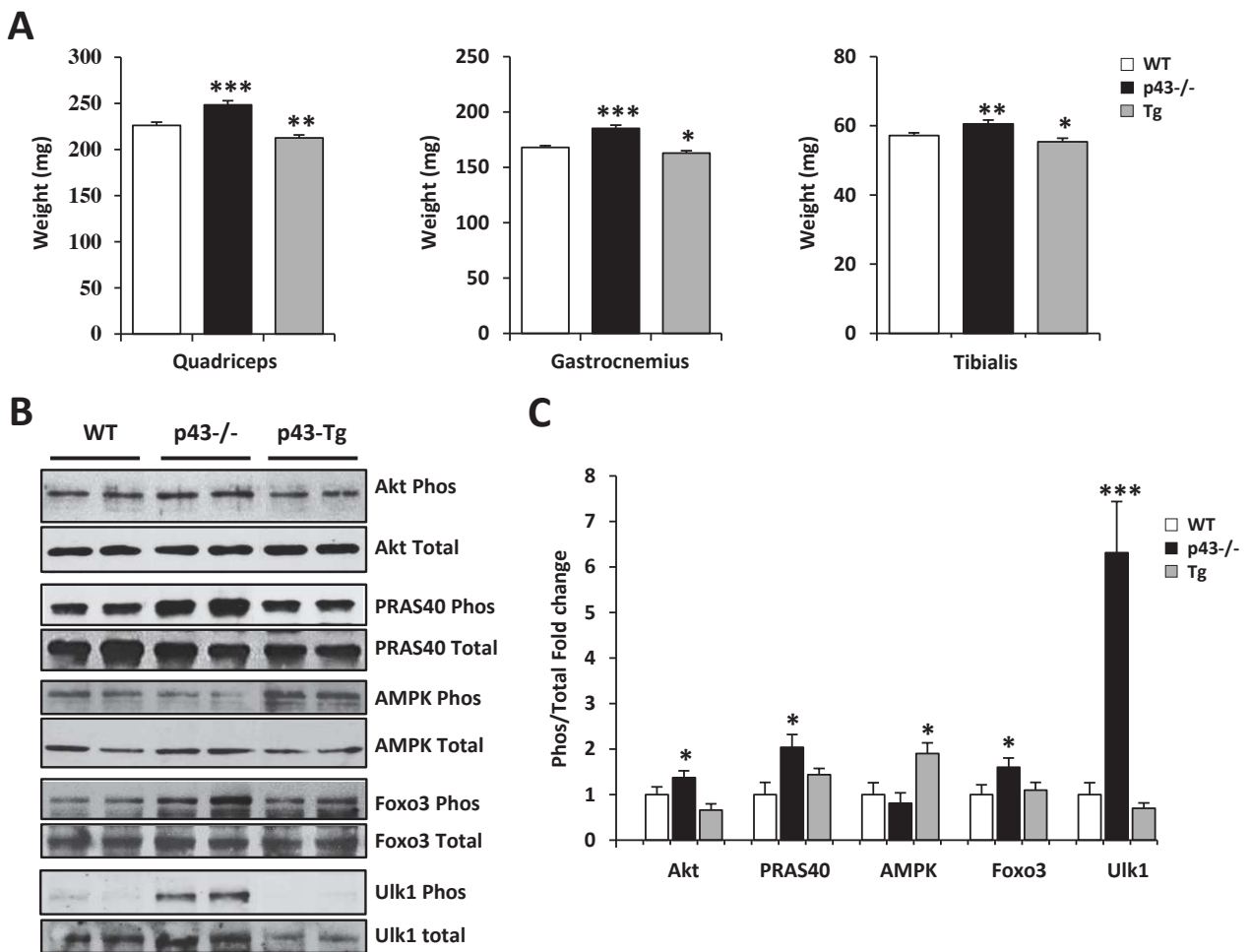


Figure 1

Figure 2

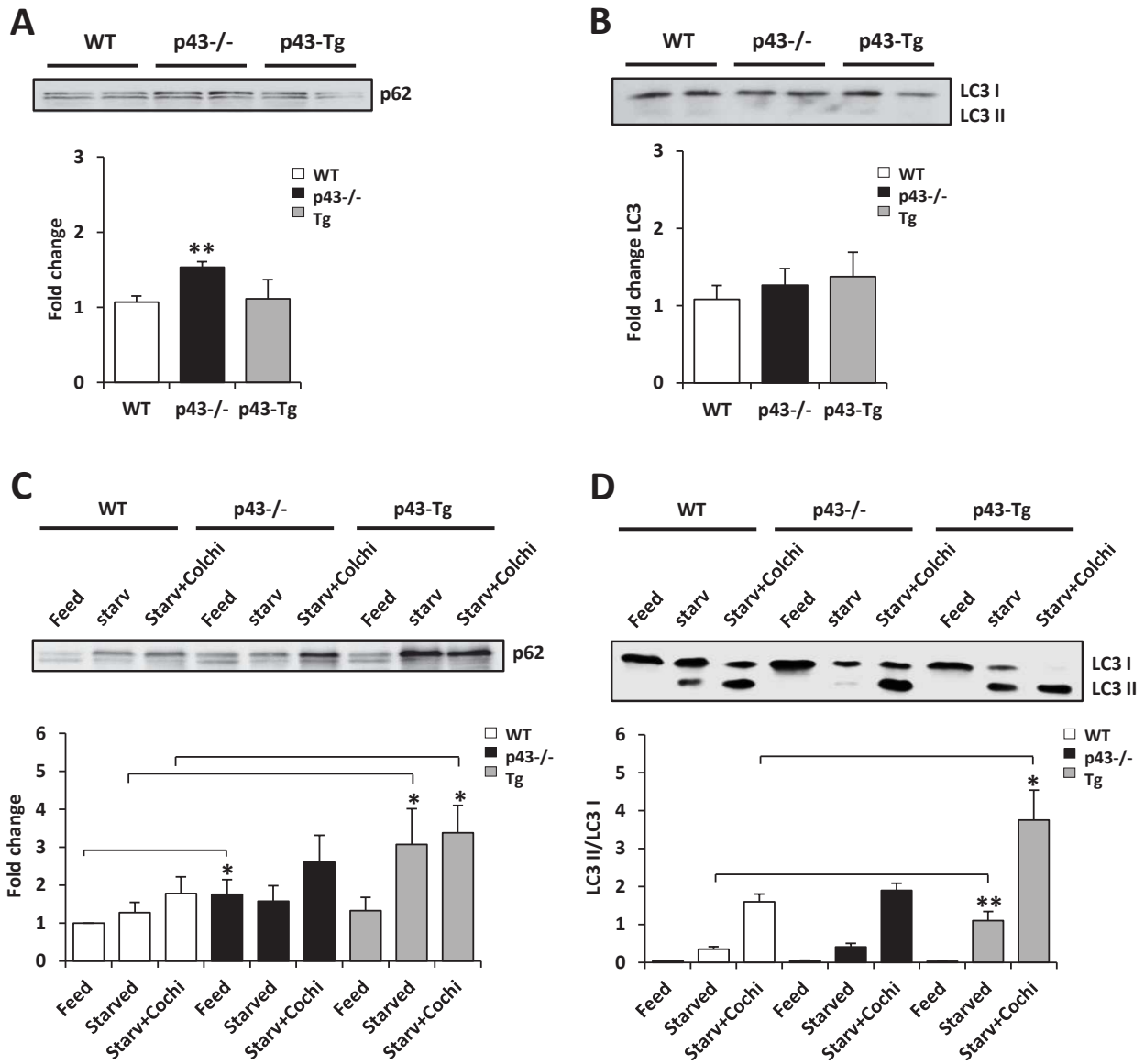


Figure 2

Figure 3

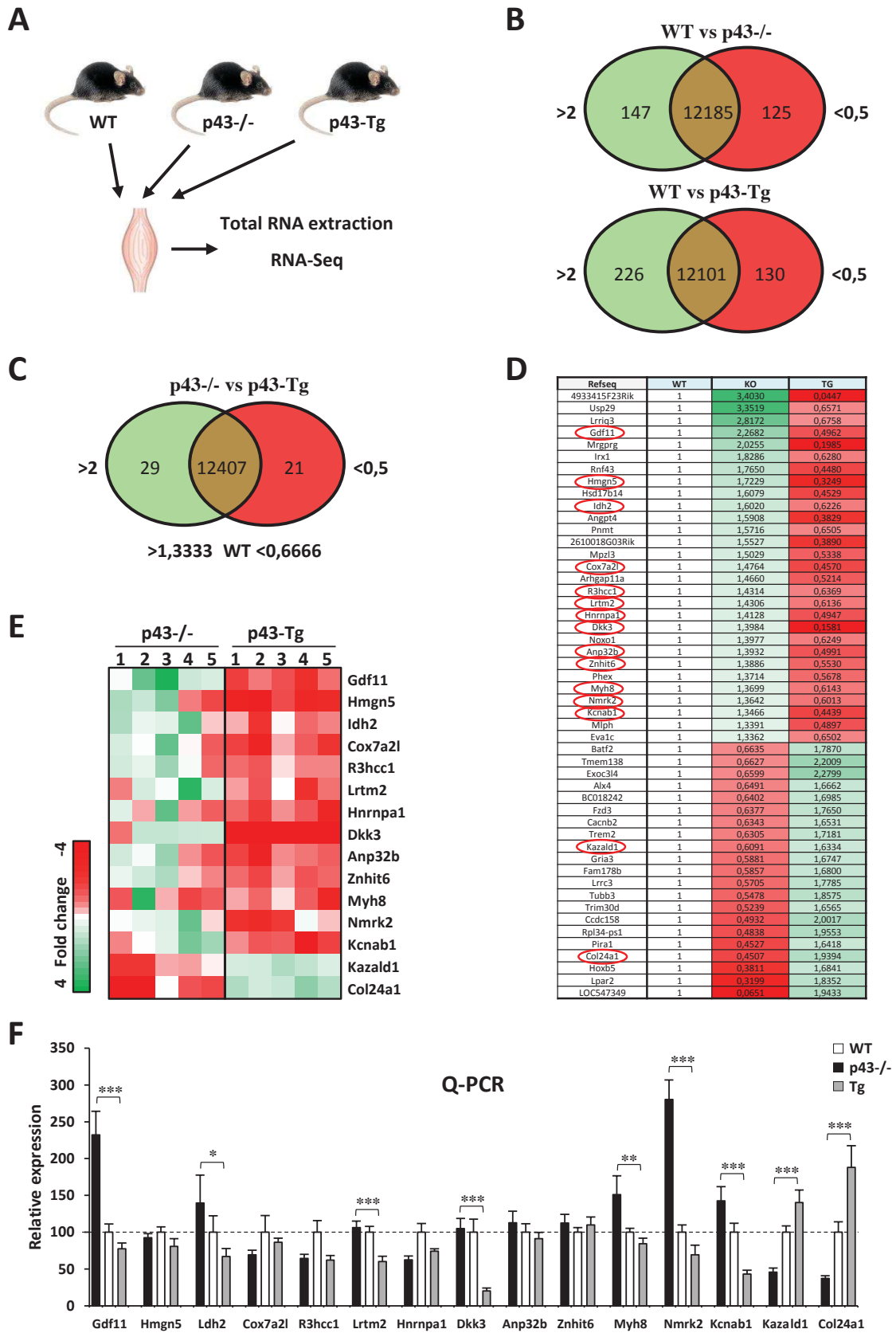


Figure 3

Figure 4

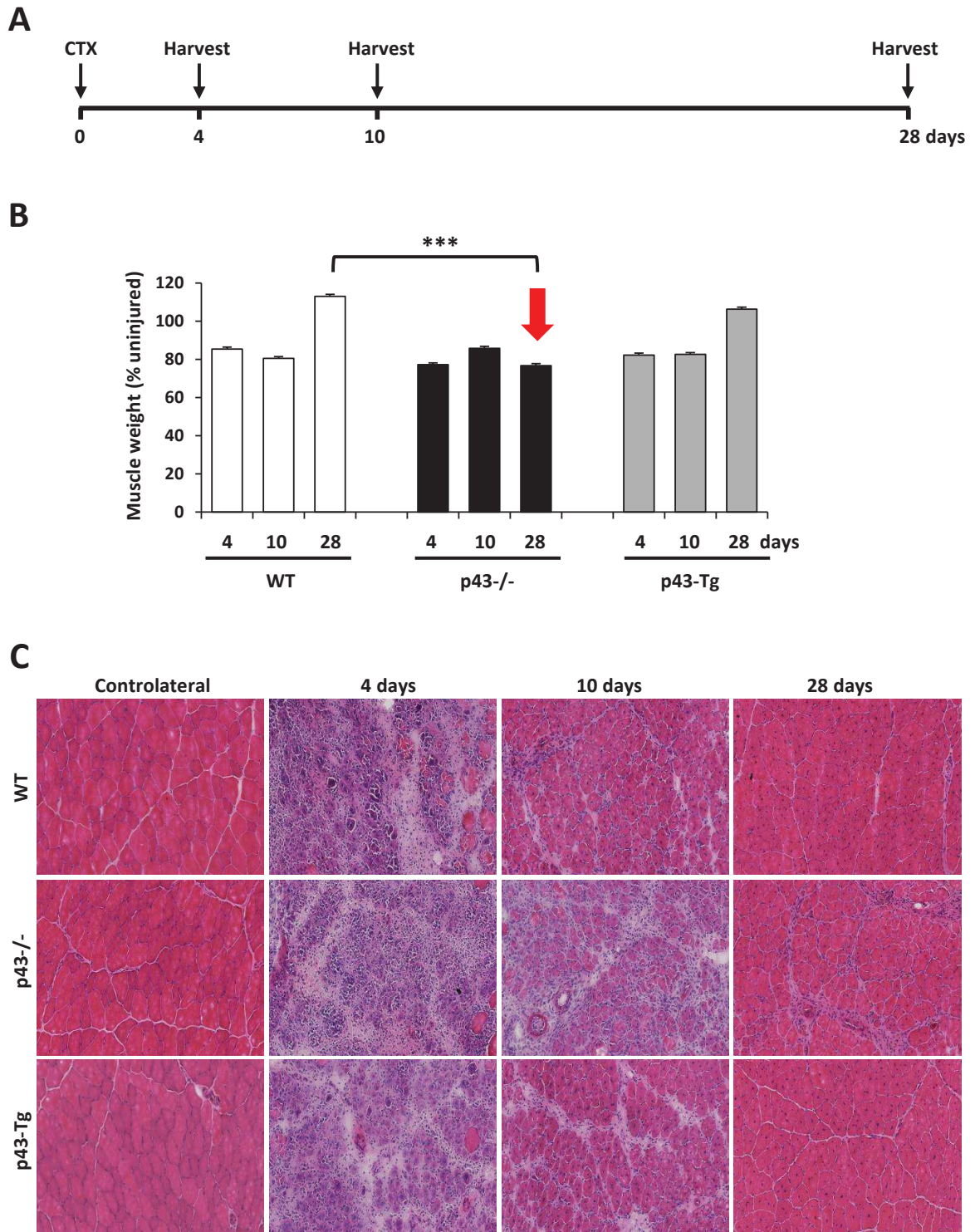


Figure 4

Figure 5

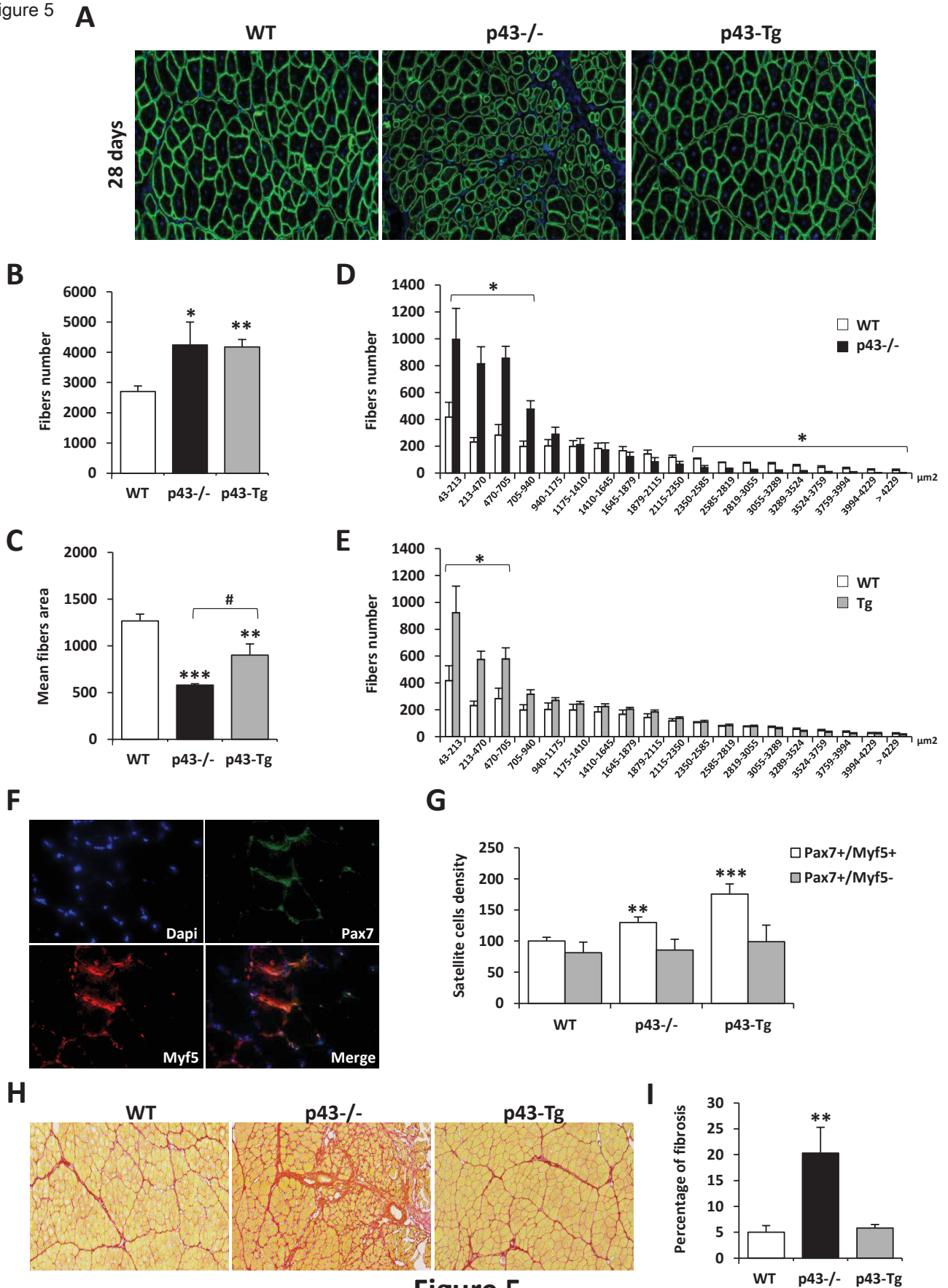


Figure 5

Figure 6

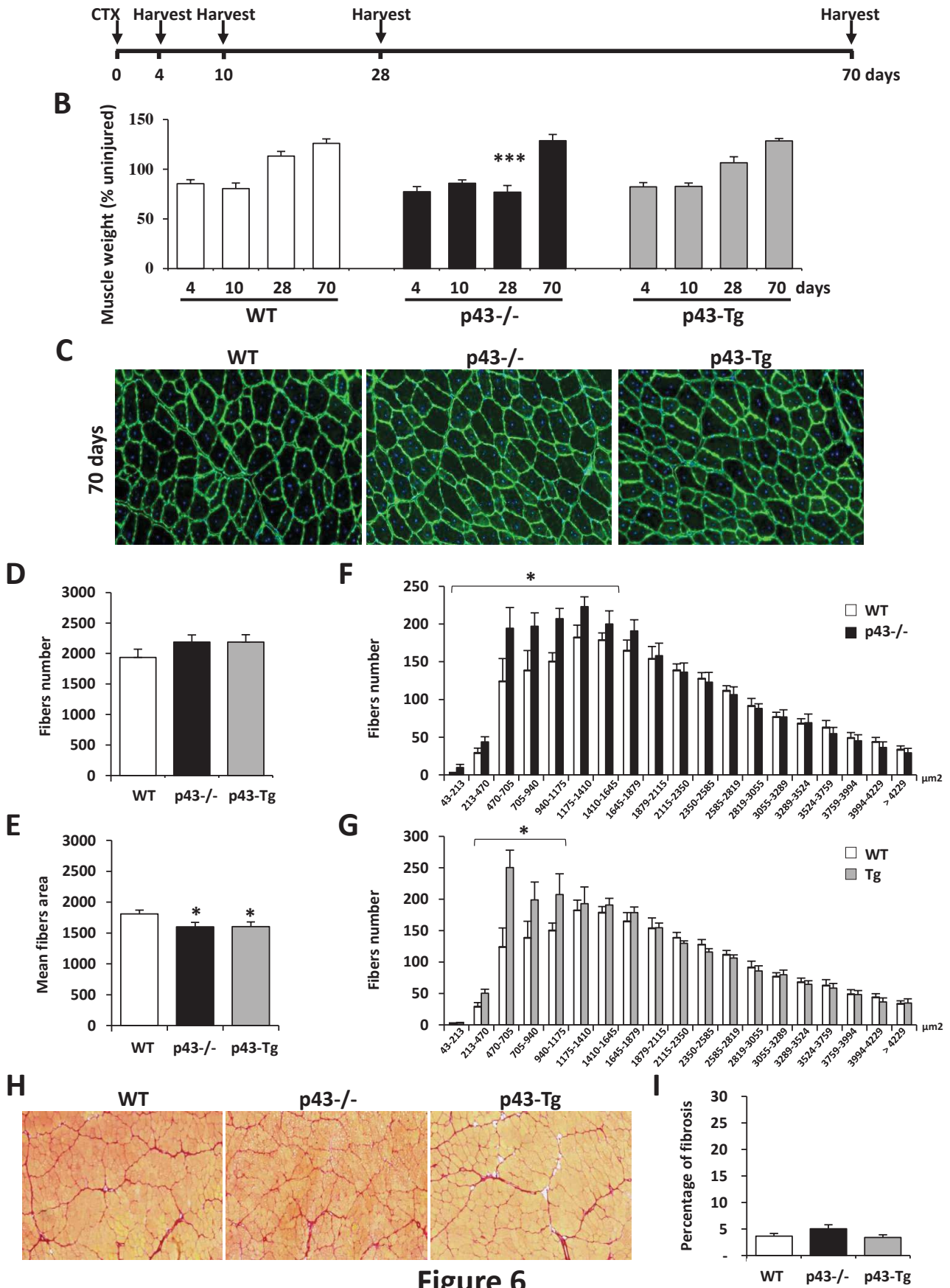


Figure 6

Figure 7

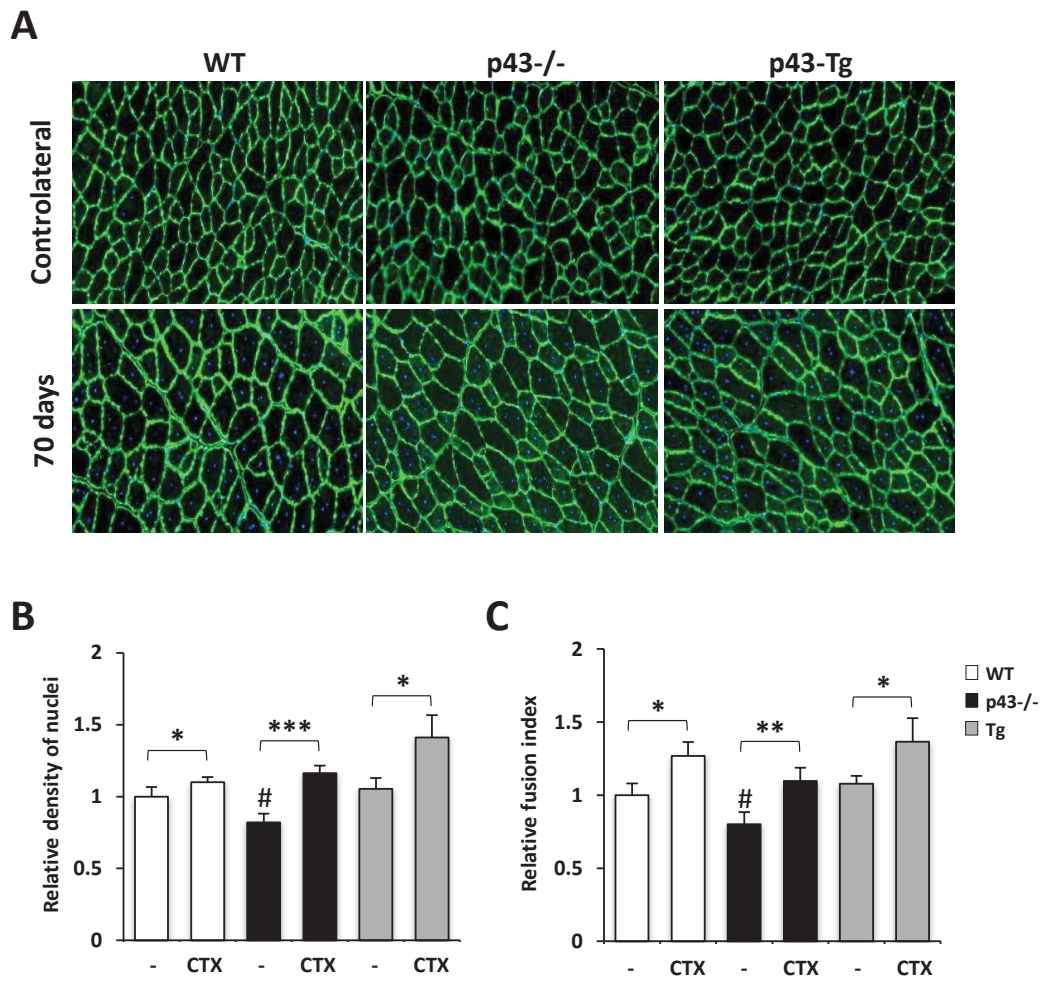


Figure 7

Figure 8

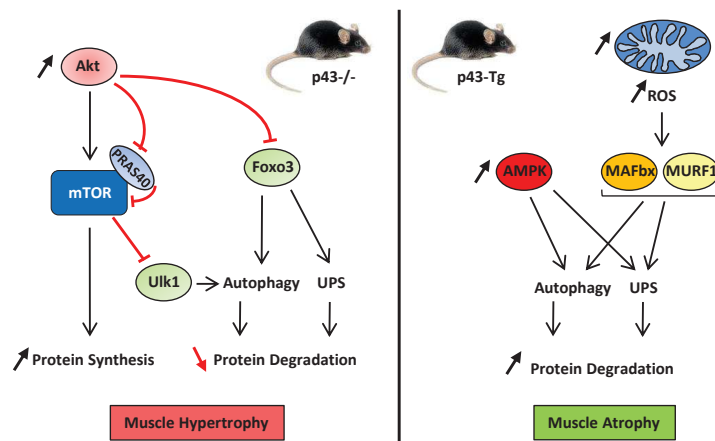


Figure 8

Figure 9

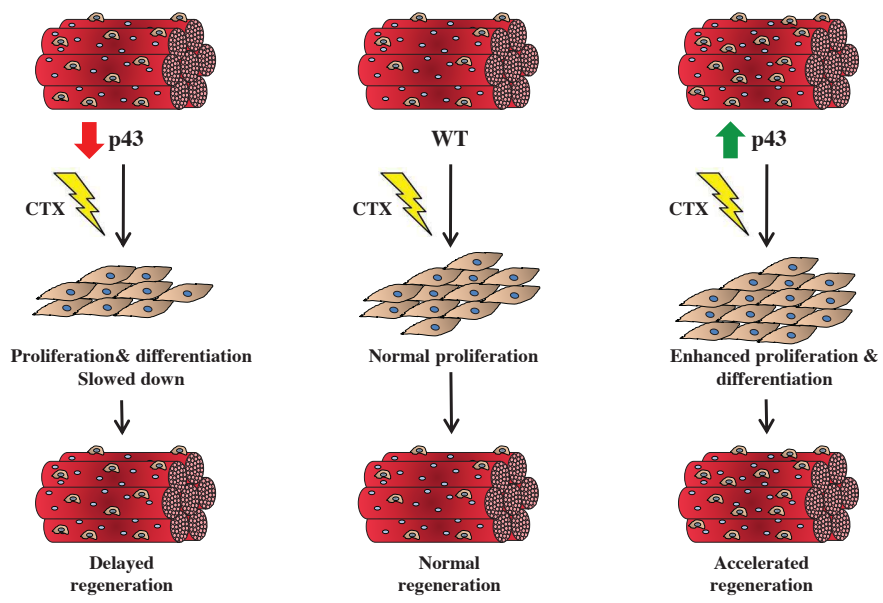
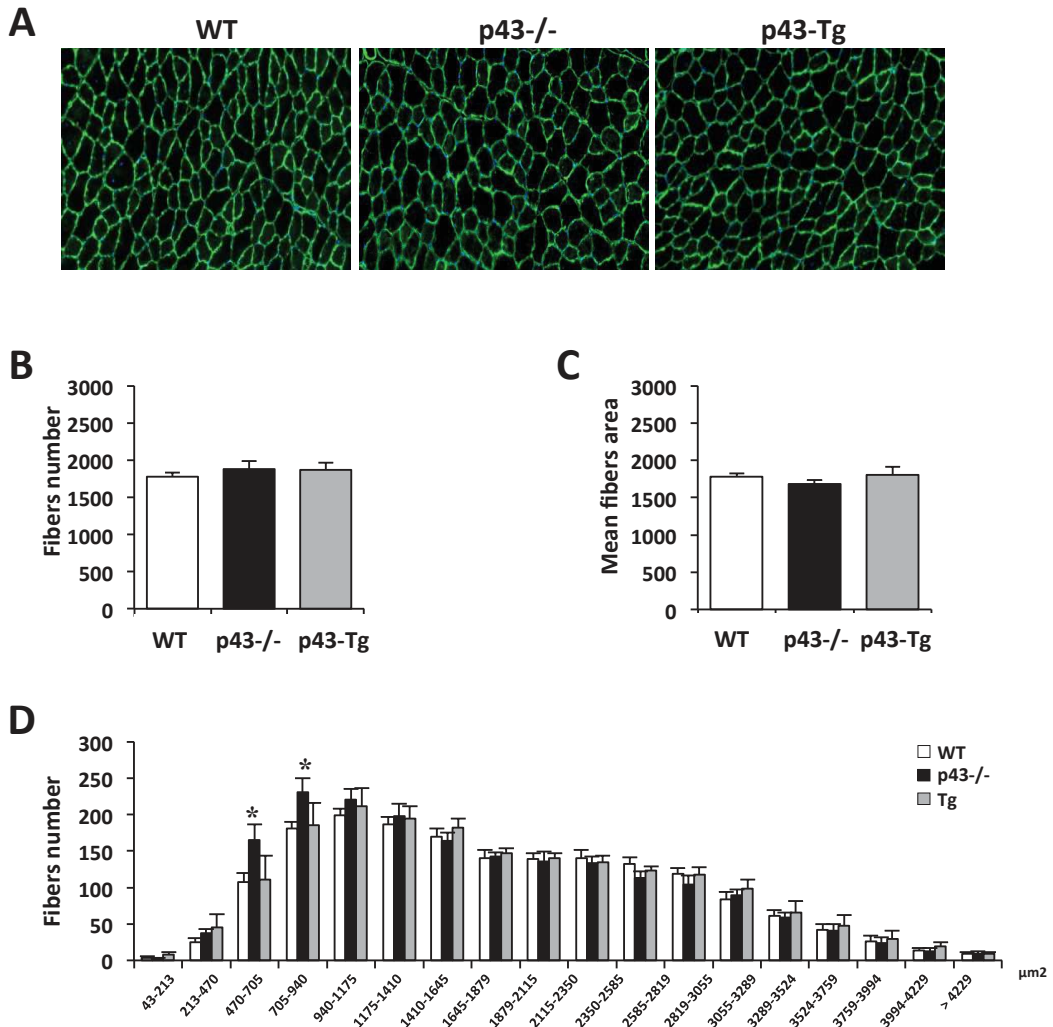
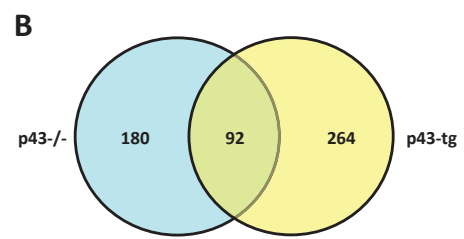
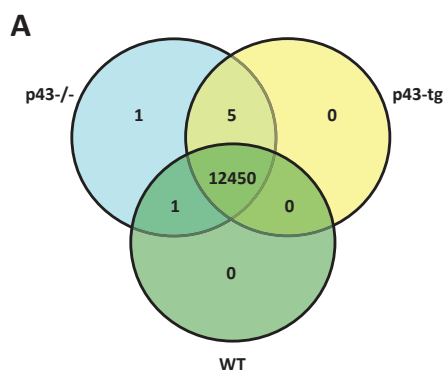


Figure 9



Supplemental Figure 1



Supplemental Figure 2

AWT vs p43^{-/-}**Molecular and Cellular Functions**

Name	p-value	#Molecules
Cell-To-Cell Signaling and Interaction	1.15E-02 - 9.62E-06	28
Carbohydrate Metabolism	7.99E-03 - 1.60E-05	17
Small Molecule Biochemistry	1.15E-02 - 1.60E-05	29
Cellular Movement	1.15E-02 - 2.21E-05	19
Molecular Transport	1.15E-02 - 6.59E-05	29

B

WT vs p43-Tg

Molecular and Cellular Functions

Name	p-value	#Molecules
Molecular Transport	1.62E-02 - 5.81E-05	30
Small Molecule Biochemistry	1.62E-02 - 5.81E-05	33
Cellular Movement	1.62E-02 - 1.06E-04	28
Carbohydrate Metabolism	1.62E-02 - 1.50E-04	18
Cell-To-Cell Signaling and Interaction	1.62E-02 - 1.59E-04	40

Cp43^{-/-} vs p43-Tg**Molecular and Cellular Functions**

Name	p-value	#Molecules
Carbohydrate Metabolism	1.59E-02 - 5.68E-06	21
Cell Death and Survival	1.62E-02 - 1.93E-05	54
Free Radical Scavenging	1.35E-02 - 2.24E-05	15
Cell-To-Cell Signaling and Interaction	1.59E-02 - 5.53E-05	38
Cellular Movement	1.59E-02 - 5.53E-05	24

Dp43^{-/-} vs p43-Tg**Top Tox List**

Name	p-value	Overlap
Mitochondrial Dysfunction	7.75E-03	5.5 % 7/127
Decreases Respiration of Mitochondria	8.36E-03	25.0 % 2/8
Swelling of Mitochondria	1.06E-02	22.2 % 2/9
Increases Renal Proliferation	1.29E-02	6.4 % 5/78
Oxidative Stress	3.24E-02	7.7 % 3/39

Supplemental Figure 3

**Protocole d'automatisation du calcul de
l'aire de surface de section des fibres
musculaires**

	Rédacteur	Vérificateur	Approbateur
Nom :	Rémi DEMANGEL		
Fonction :	Doctorant	Laurence PESSEMESSE	VERNUS Barbara
Visa :			

Objectifs du protocole :

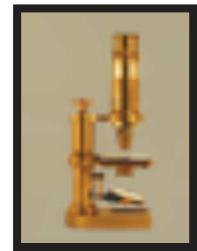
Ce protocole est destiné à l'automatisation et le calcul de la CSA des fibres musculaires *via* le logiciel *ImageJ*.

Pour cela, il faut s'assurer que les images à traiter soient toutes prises au même grossissement, et de la même qualité/résolution. Ceci afin de réduire au maximum les biais et erreurs de mesures.

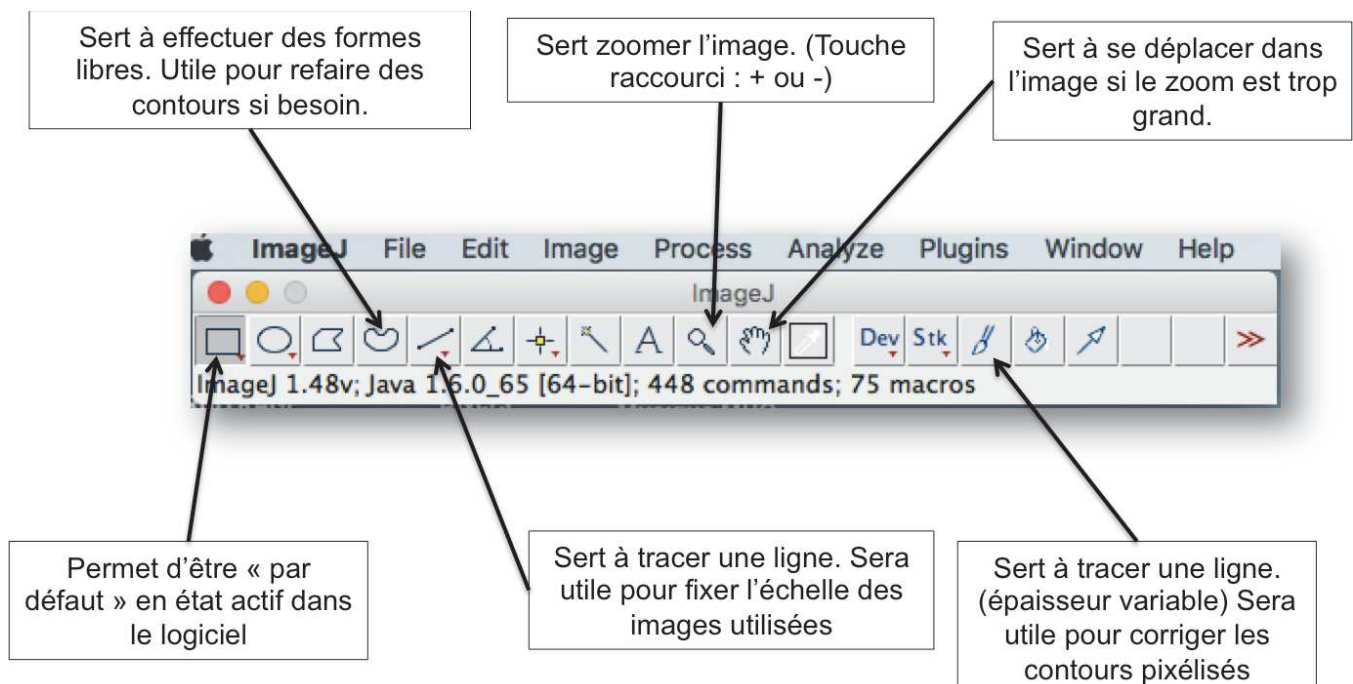
Présentation du logiciel :

✚ Identification du logiciel

- Tout d'abord, voici l'icône du logiciel ImageJ que nous allons utiliser :



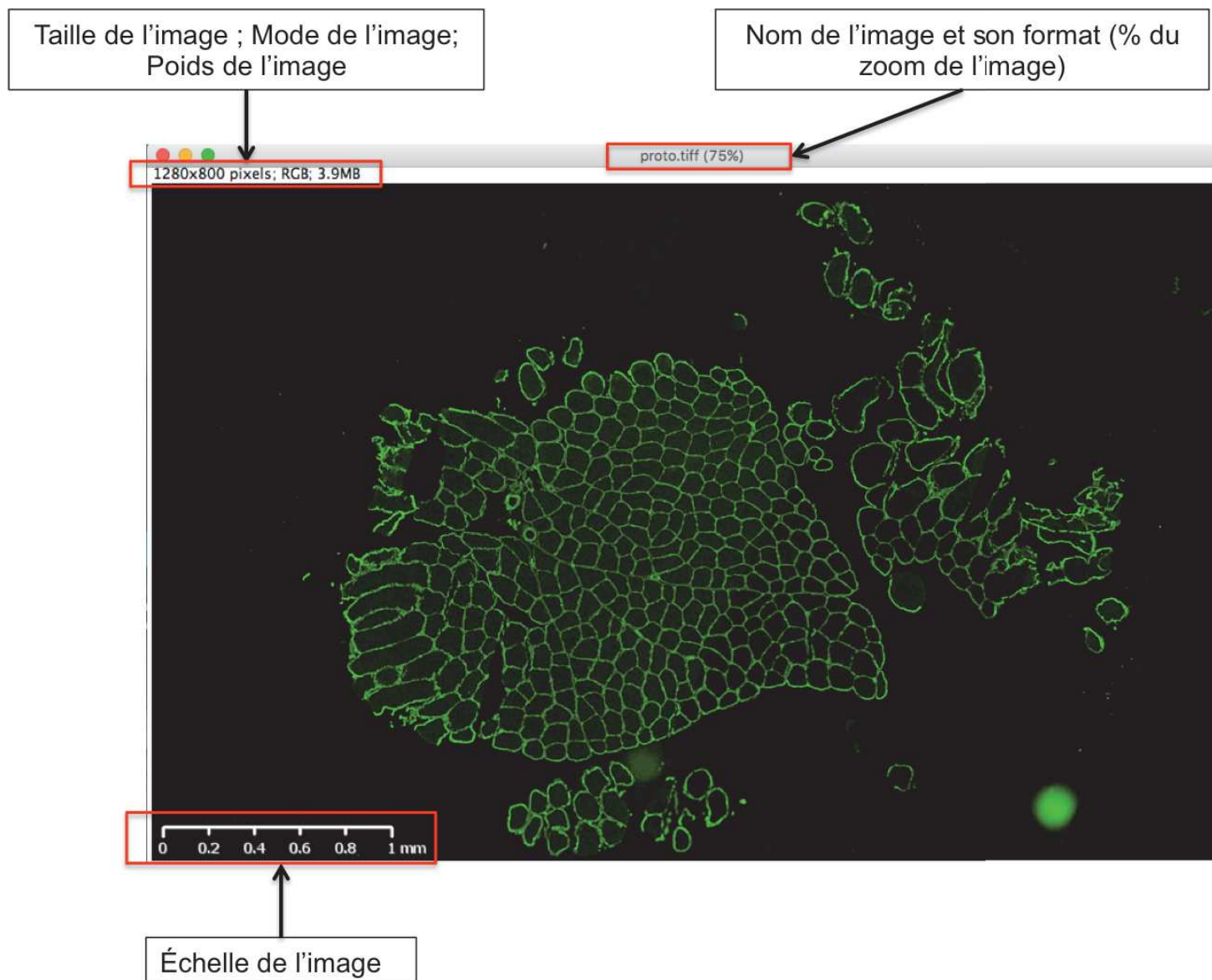
- Lorsque le logiciel, une barre d'outils s'ouvre, et les menus additionnels s'affichent. Voici une brève description des outils que nous serons amenés à utiliser.



Présentation du protocole:

1^{ère} étape : Ouverture de l'image dans le logiciel et conséquences :

Nous allons effectuer le détail de ce protocole à l'aide d'une image issue d'une biopsie musculaire de Vastus Lateralis humain. Cette biopsie a permis d'effectuer des coupes cryostat d'épaisseur 10 μ m. Un marquage immunofluorescent de la Laminine a été effectué sur cette coupe. Ceci permet de marquer le contour des fibres musculaires de cette coupe. L'image a été obtenue avec un scanner Hamamatsu situé à l'INM de Montpellier. Voici ce qu'il se passe lorsque nous l'ouvrons dans le logiciel *ImageJ*.



Commentaires sur l'image :

- ❖ Il faut donc s'assurer que toutes vos images soient à la même taille (ici 1280x800 pixels) pour que l'échelle ne diffère pas.

- ❖ Il faut également s'assurer que le format de votre image soit en TIFF, et non en JPEG.

✚ 2^{ème} étape : Tracer l'échelle de l'image pour une mesure optimale.

Cette étape est sensiblement la plus importante. En effet, si votre échelle est fautive ou mal faite, ce sont mesures et par extension vos résultats finaux qui seront faussés, et vous devrez tout refaire. Voici donc le processus de réalisation et une méthode de vérification.

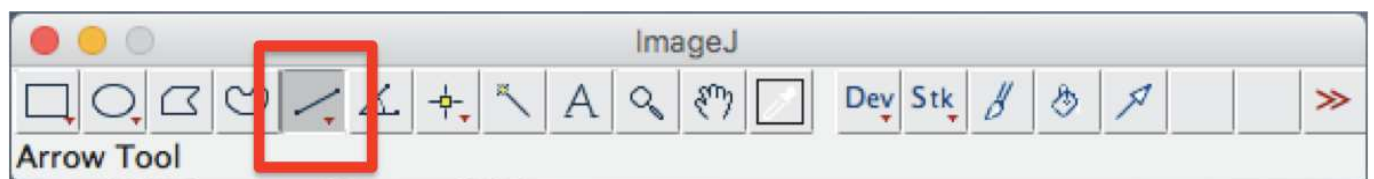
- Sélectionner l'outil « **Zoom** » afin de grossir la zone où se trouve l'échelle. Avec le **clik gauche**, la zone s'agrandit. Avec le **clik droit**, la zone se rétrécit. Même principe avec les touches « + » et « - » du clavier.



- Avec l'outil « **déplacement** », optimiser la zone d'affichage pour se focaliser sur la zone où se trouve l'échelle de l'image.



- Sélectionner l'outil « **Trait** ».



- ❖ Sur l'image zoomer au maximum pour effectuer un trait le plus précis possible. Plus votre trait est grand, plus votre échelle sera précise car les erreurs seront minimisées.

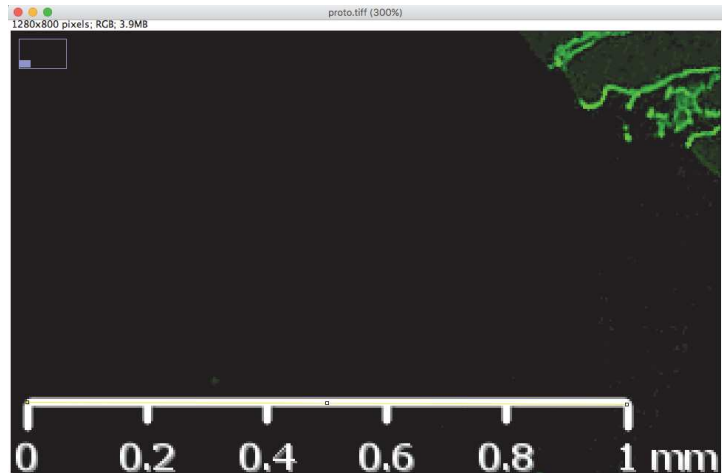
Exemple :

Si l'on mesure une distance de $49\mu\text{m}$ au lieu de $50\mu\text{m}$, le pourcentage d'erreur est de 2%. Pour une fibre de $5000\mu\text{m}^2$, elle mesurerait $5100\mu\text{m}^2$.

Alors que si l'on mesure une distance de $999\mu\text{m}$ au lieu de $1000\mu\text{m}$, le pourcentage d'erreur est de seulement 0,1% soit 20 fois plus précis. Cette fois, la fibre mesurerait donc $5005\mu\text{m}^2$.

Commentaires sur l'image :

- Nous avons notre zone d'intérêt qui se trouve à 300% d'affichage (entre parenthèse dans le bandeau gris).
- Nous apercevons un fin trait jaune sur la ligne blanche de l'échelle, dont 3 carrés au dessus du 0 et du 1 mm ; et un entre le 0.4 et 0.6. C'est ce trait qui nous sert d'échelle (prochaine étape).



- ❖ Une fois le trait fixé, aller dans le menu « Analyze » et sélectionner « Set Scale » (2). Une petite fenêtre s'ouvre. (3)

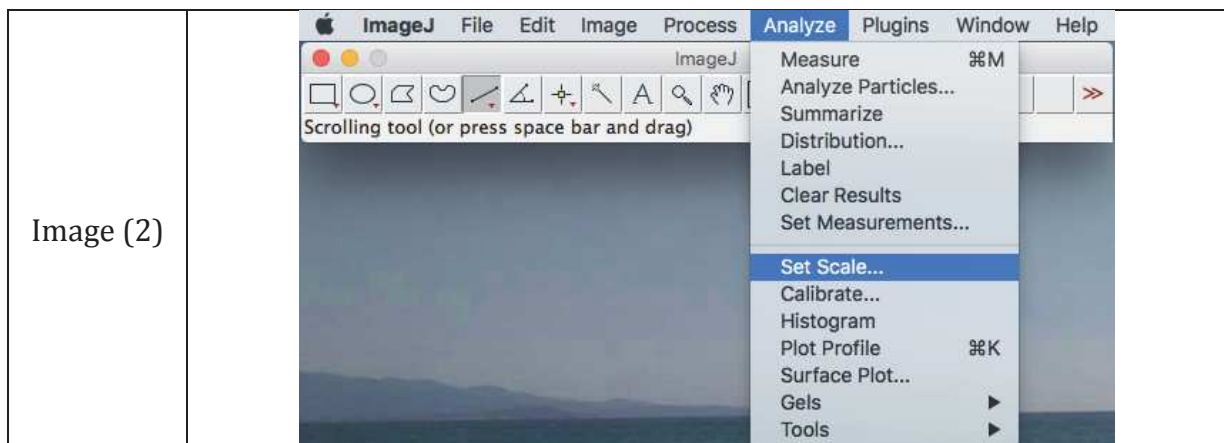
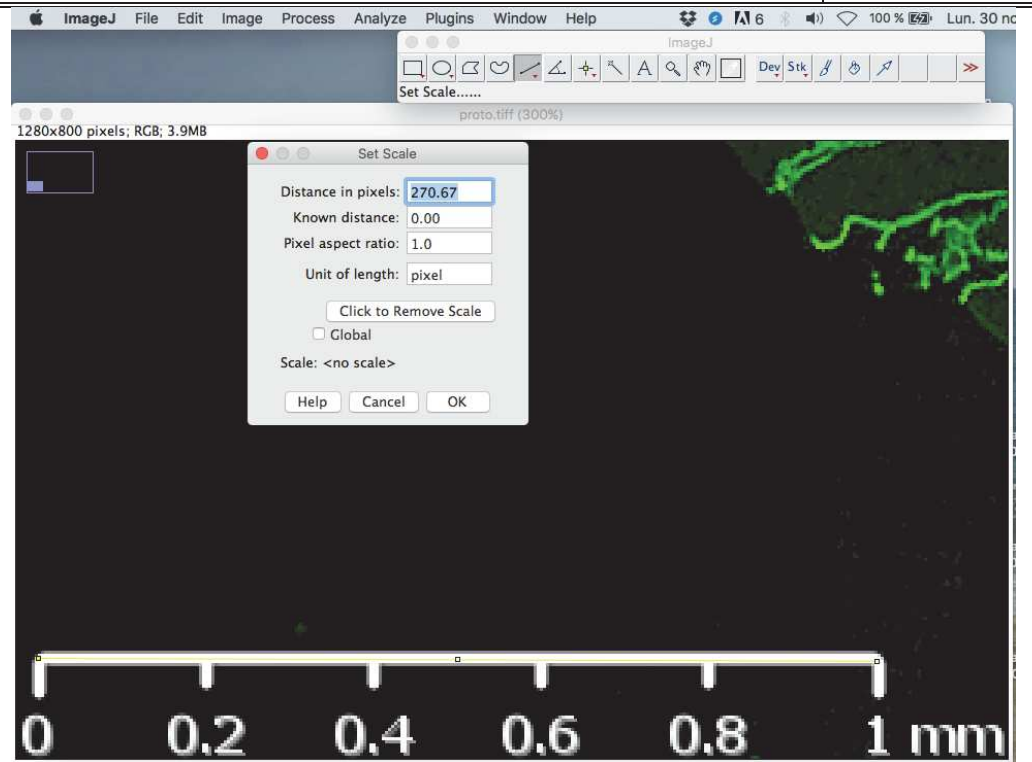


Image (3)



Commentaires sur l'image (3) :

- ❖ La fenêtre « Set Scale » sert à renseigner les différentes informations de l'échelle.
- ❖ On aperçoit toujours notre trait jaune qui est pris en compte pour la mesure.

Détails de la fenêtre « Set Scale » :

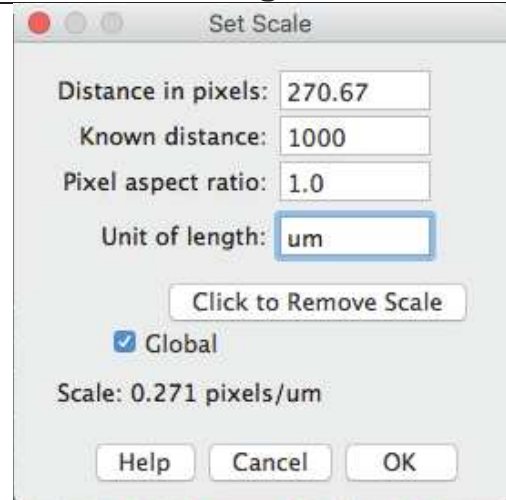
- « **Distance in pixels** » : est la mesure de notre trait jaune effectué sur l'image.
- « **Known distance** » : traduit par « distance connue ». il s'agit de la valeur référence de notre trait. Ici notre trait mesure 1000mm.
- « **Pixel aspect ratio** » : est la taille d'un pixel. Soit un carré de 1x1. Ne pas toucher cette valeur.
- « **Unit of length** » : est le nom de l'unité de notre échelle. Ici, nous travaillons en micromètre ; donc à remplacer par « um ».
- l'onglet « **Click to Remove Scale** » : sert à remettre les valeurs écrites à zéro. Cela annule TOUS les paramètres saisis.
- « **Global** » : est très important. Il permet d'appliquer les paramètres saisis, et donc l'échelle ; a TOUTES les photos que vous ouvrirez. Fortement conseillé pour ne pas refaire l'échelle 20 fois.

Commentaires sur l'image 4 :

- Voici à quoi ressemble la fenêtre « Set Scale » correctement remplie. Il ne reste alors plus qu'à cliquer sur « OK »

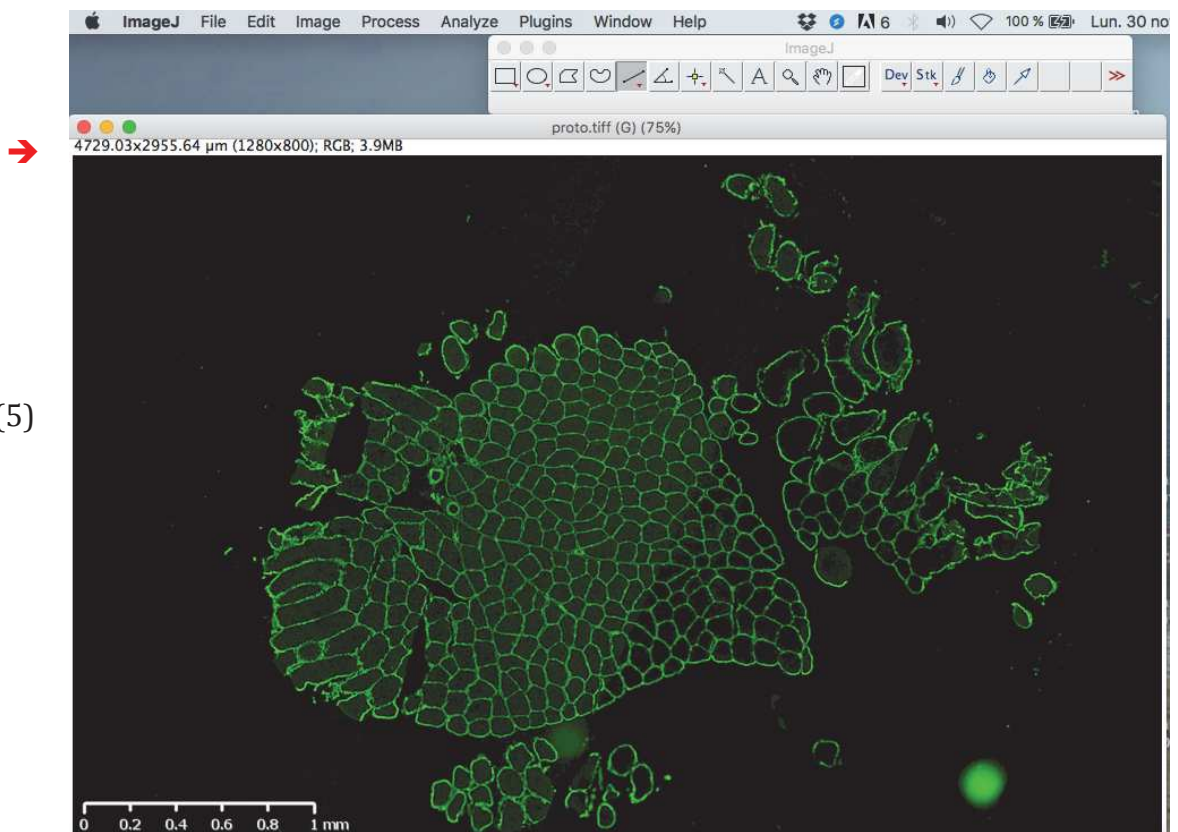
NB : Notre échelle est donc **0,271 pixels/μm**.
Il s'agit de la ligne « Scale ».

Image 4



- ❖ On observe que la taille de l'image n'est plus en pixel, mais bien en « μm » : **4729.03x2955.64 μm**.

Image (5)



Pour vérifier cela, souvenons-nous que la taille de l'image est de 1280x800 pixels (valeurs entre parenthèses). Un simple produit en croix, nous permet d'affirmer que :

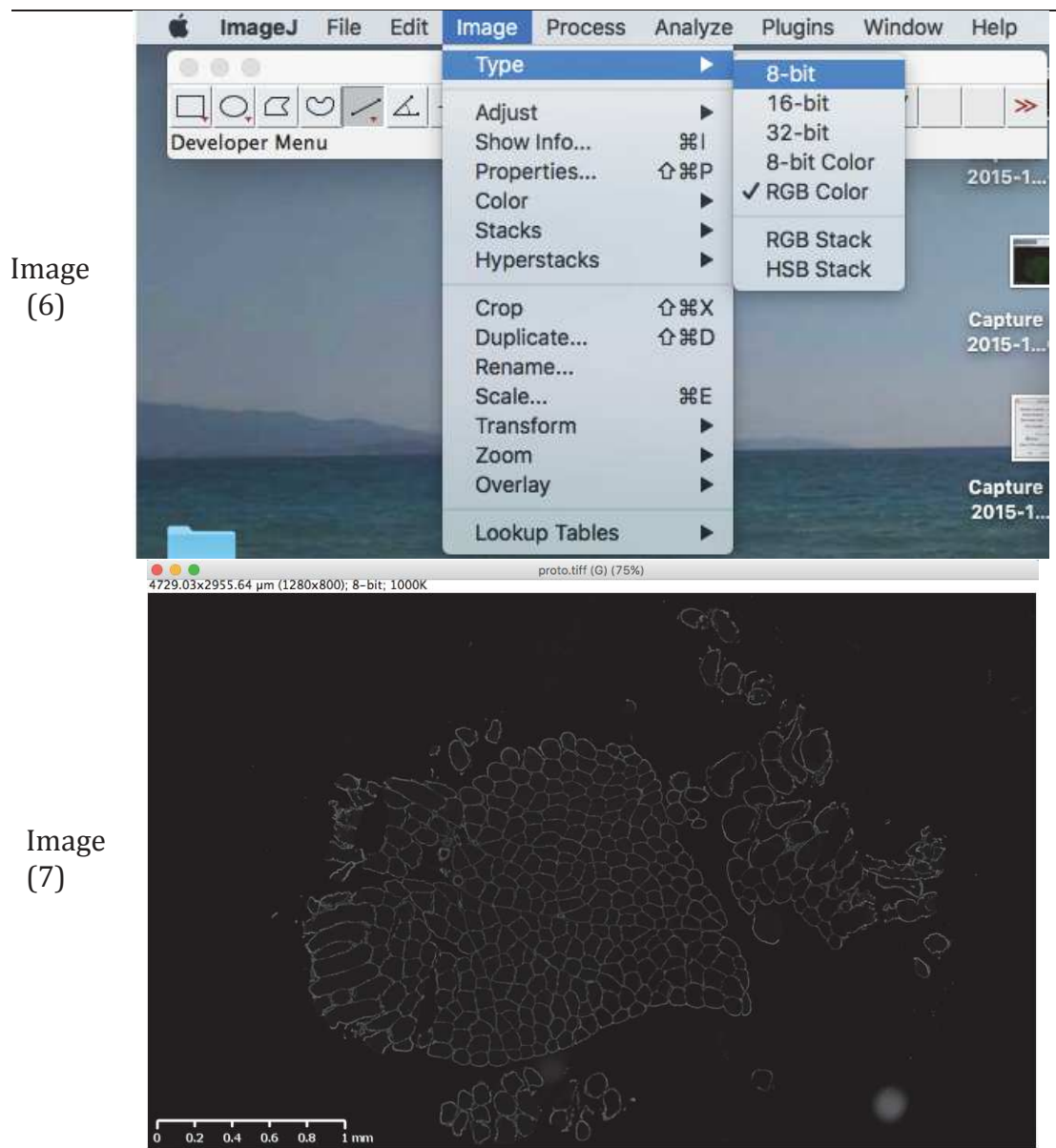
$$\text{Si } 0,27067 \text{ pixels} = 1 \mu\text{m} \quad X = \frac{1280 \times 1}{0,27067} \quad X = 4729,00 \mu\text{m} ; \text{ Il s'agit bien de notre valeur !!}$$

- Ici, notre échelle est fixée, et vérifiée. Nous pouvons maintenant traiter l'image pour l'analyse automatique des fibres musculaires.

✚ 3^{ème} étape : Traitement de l'image.

Cette étape est déterminante pour le comptage automatique. 2 étapes sont primordiales : Le passage en « 8-bits » de l'image et l'ajustement du « Threshold ».

- ❖ Le passage en « 8-bits » permet à l'image de passer en niveaux de gris (6). Notre couleur d'image qui était verte, passera en « noir et blanc » (7).

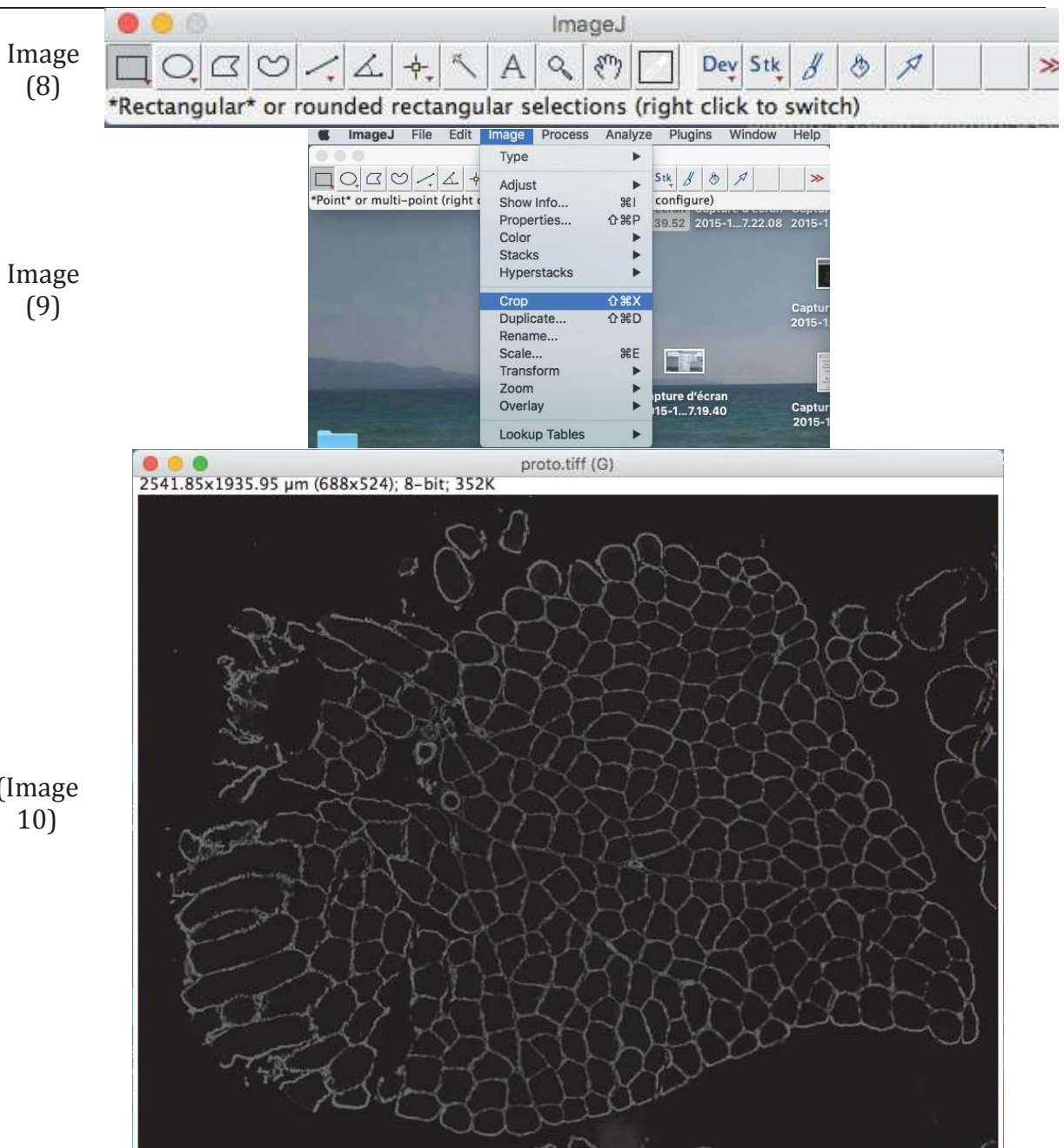


Commentaires sur l'image (7) :

- ❖ Notre image a perdu sa couleur verte au détriment d'une nuance de gris.
- ❖ En regardant les détails de l'image, on s'aperçoit que l'image est bien en 8-bits. Ceci a diminuée le poids de l'image : de 3,9MB à 1000K.

L'image est prête à être traitée. Cependant, toute l'image n'est pas exploitable. Pour cela, nous allons rogner l'image (Croper). Nous allons donc supprimer la zone où se trouve l'échelle, la partie à droite ainsi que celle du bas de l'image. Ceci va permettre de réduire la zone d'intérêt et de traitement de l'image. De cette manière, ImageJ sera plus efficace.

- ❖ Rogner l'image selon la zone d'intérêt préselectionnée avec l'outil « Rectangle » (8), grâce à ImageJ (9) ou au raccourci clavier (Ctrl+Maj+X) (10).

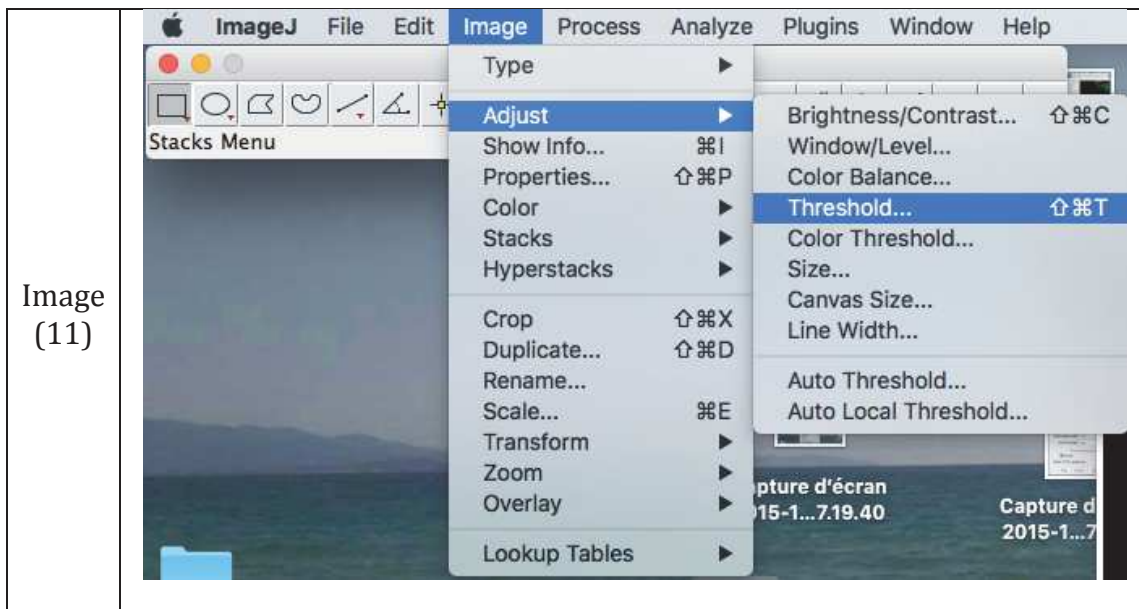


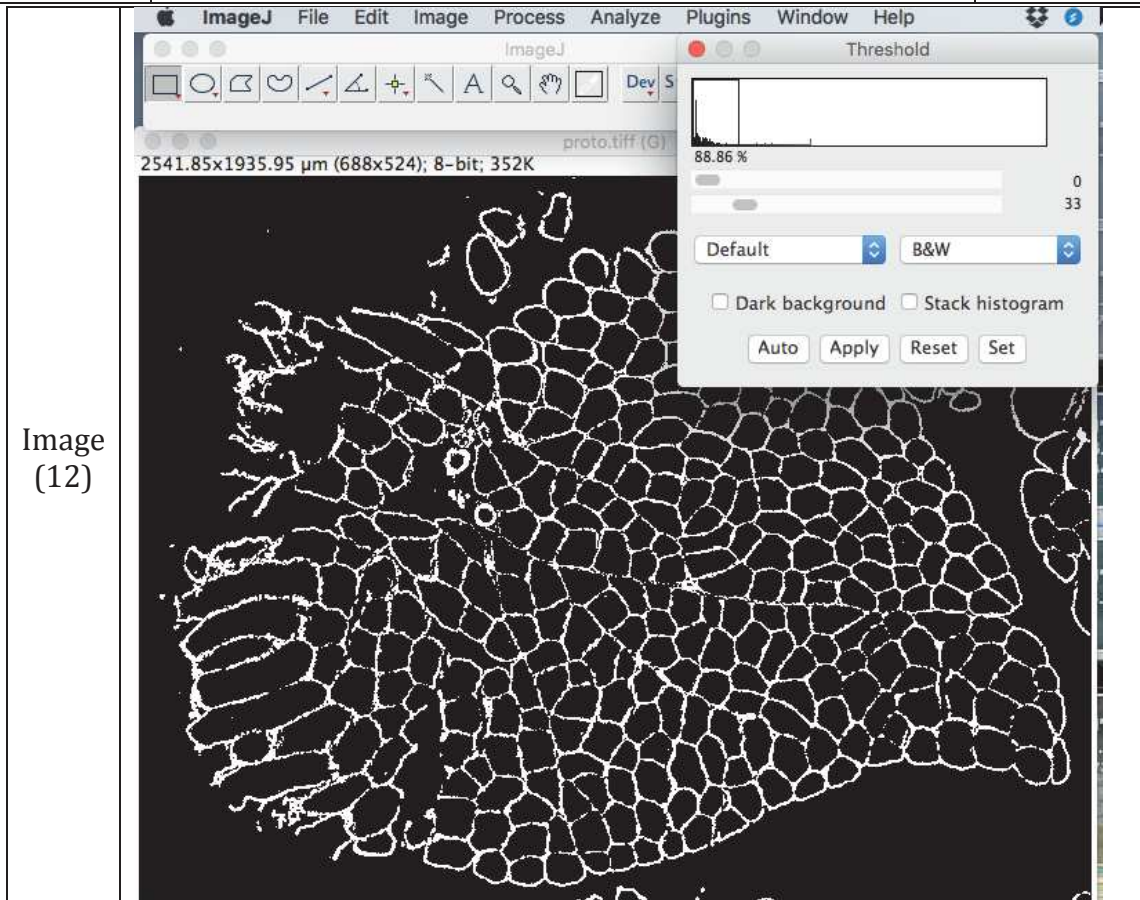
Commentaires sur la photo (10) :

- ❖ L'image plus petite, elle est plus simple à observer.
- ❖ On remarque que la taille de l'image a diminué : **2541,85x1935,95 μm** ; ainsi que sa taille : **352K**.

❖ Ajustement du Threshold de l'image

Le passage au « Threshold » permet de binariser l'image en noir et blanc (11). Le marquage initialement vert sera alors blanc. Une fenêtre pour régler le « Threshold » s'ouvre en même temps (12)





Commentaires sur l'image (12) :

- ❖ Si on observe le marquage blanc, on s'aperçoit que les contours ne sont pas complets par endroit.
- ❖ La fenêtre « Threshold » exprime un pourcentage de pixel apparent sur l'image, ici 88,86%.

Après avoir réglé le Threshold, nous pouvons exécuter le calcul automatique de la CSA de nos fibres. Pour cela, nous utilisons l'outil « Analyze Particles » (13). Une fenêtre « Analyze Particles » s'ouvre. Les paramètres que nous allons remplir vont nous permettre d'affiner le calcul automatique. (14)

Image (13)

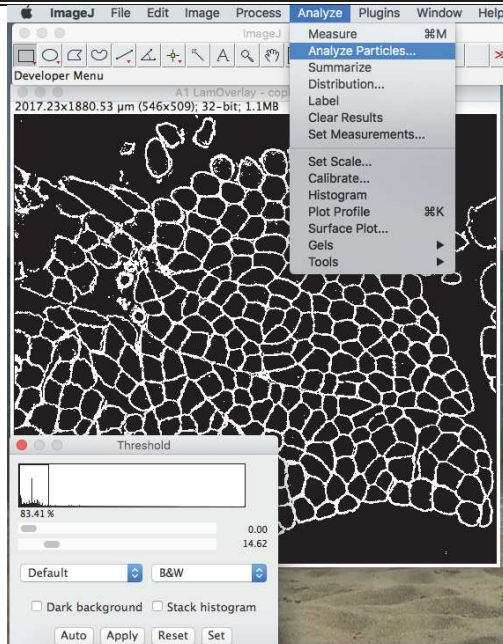
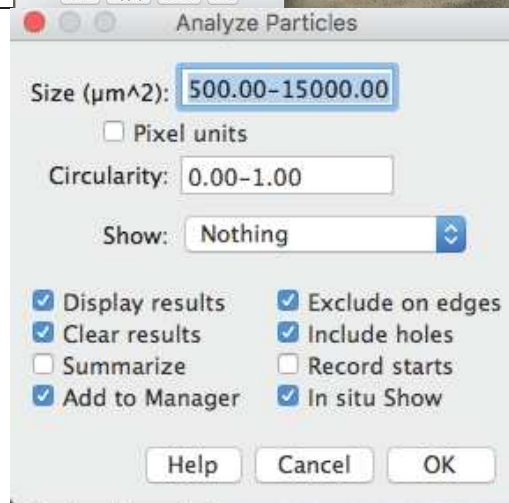


Image (14)

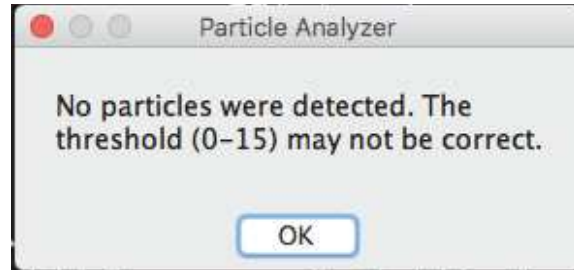


Commentaires sur l'image (14) : Cette fenêtre va nous permettre d'affiner le calcul automatique de la CSA des fibres.

- « Size (μm^2) » : correspond à l'intervalle de l'aire souhaité qui va être mesuré. Ici de 500 à 15000 μm^2 .
- « Circularity » : NE PAS TOUCHER. Permet de signifier que la mesure s'effectue sur des fibres entièrement pleines, incomplètes.
- « Show » : NE PAS TOUCHER. Le laisser par défaut sur « Nothing ».
- « Display results » : Efface les anciennes et garde les nouvelles mesures effectuées si on relance un calcul.
- « Clear results » : Ne stocke pas les anciennes mesures effectuées.
- « Summarize » :
- « Add to Manager » : permet de stocker les mesures effectuées dans une fenêtre spécifique.
- « Exclude on edges » : exclue les fibres qui sont au bord de l'image ET incomplètes.
- « Include holes » : permet d'inclure les trous éventuels dans une fibre s'ils sont détectés.
- « Record starts »
- « In situ show » : Permet d'afficher en temps réel les mesures effectuées.

(Image 15)

→ **ATTENTION** : À cette étape, il se peut que vous ayez un message d'erreur qui apparaisse, ce qui empêche le calcul automatique.



Ceci peut résulter de quelques anomalies de l'image. Par exemple :

- Il n'y a pas assez de pixels. Il faut donc Augmenter le pourcentage du Threshold.
- La taille de l'image est trop conséquente. Pour cela, il faut rogner un peu plus l'image.
- Les fibres ne sont pas assez distinctes. Dans ce cas, manuellement, il faut retravailler l'image.
- La luminosité de l'image est trop faible. Dans ce cas, avec le raccourci clavier « Ctrl+Maj+C » renforcer l'intensité de l'image.

✚ Étape intermédiaire 3bis : Retouchage de l'image.

Augmenter l'intensité de l'image (brightness et contrast) permet de renforcer les contours.

Attention à ne pas saturer l'image avec du signal perturbant la qualité de votre image initiale. Ajuster avec Minimum et Maximum la qualité de votre image.

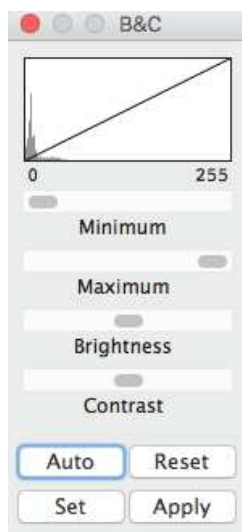


Image (16)

Améliorer le contour des fibres permet de distinguer chaque fibre entre elle. Voici un exemple de fibres incomplètes.

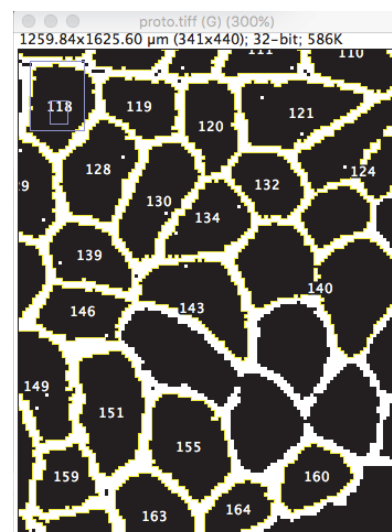
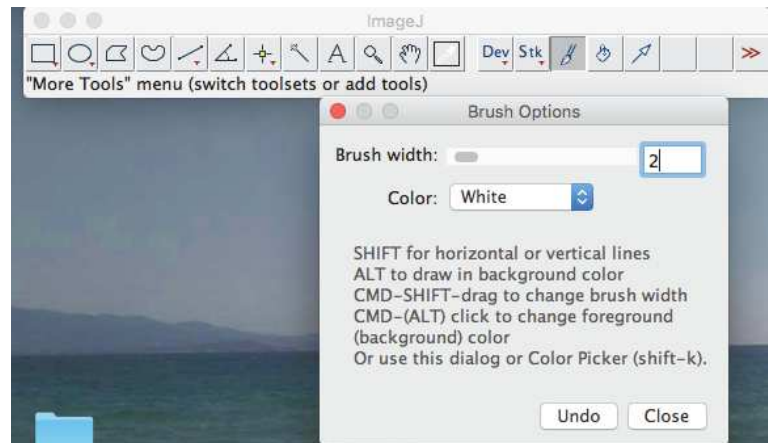


Image (17)

On s'aperçoit que la fibre 140 est composée de deux fibres, tout comme la 124! On s'aperçoit également que les deux fibres entre la fibre 143 et 155 ne sont pas mesurées. Ceci est du à l'intervalle fixé pour mesurer l'aire. Ces trois fibres réunies sont très certainement supérieures à $15000\mu\text{m}^2$. Sur cette image nous allons donc corriger ces anomalies d'image.

Image (18)

Sélectionner l'outil « paintBrush » et le régler sur 2pt, color White et retoucher l'image.



Effectuer les retouches sur la zone ou les zones souhaitées

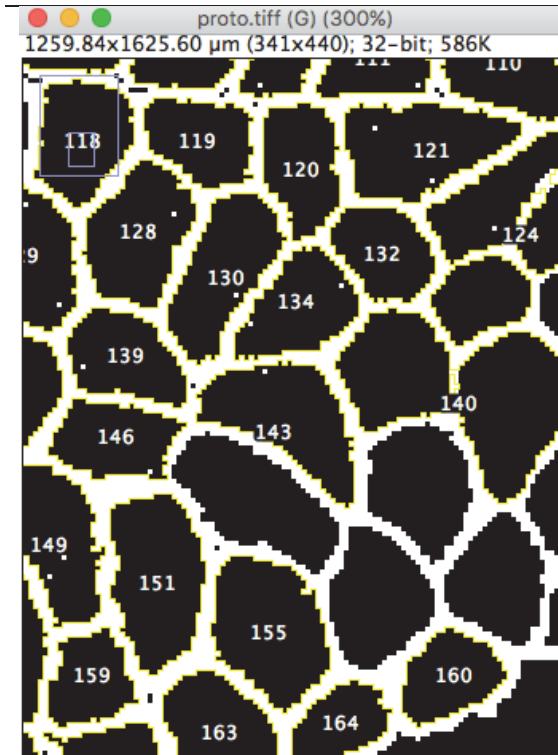


Image (19)

Relancer l'analyse automatique sans changer les paramètres



Image (20)

Commentaires sur l'image (20) :

- ❖ Après avoir retoucher les contours de bord (1), les fibres ont pu être mesurées.
- ❖ On s'aperçoit également, que les numéros ont changés, notamment la 155 qui est devenue 161 grâce au fait d'avoir rajouter la 141, 143, 150, 151 et 158.

ATTENTION :

Sur l'image (21), fibre 124. Il s'agit un piège ! Si on observe le coin en haut à gauche de la fibre non numérotée (entre la 124-133-141-143), il se trouve qu'il y a une ligne de pixel qui ne permet pas la distinction de ses fibres (cadre rouge). Il faut veiller à ce que les pixels noirs ne se touchent en aucun cas par le coin.

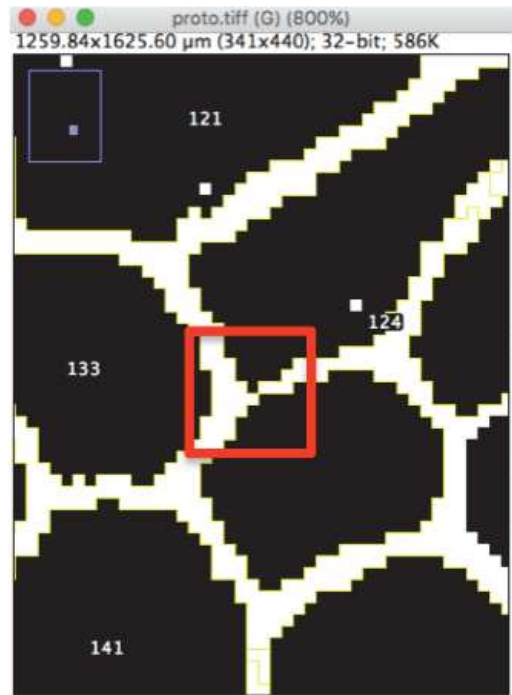
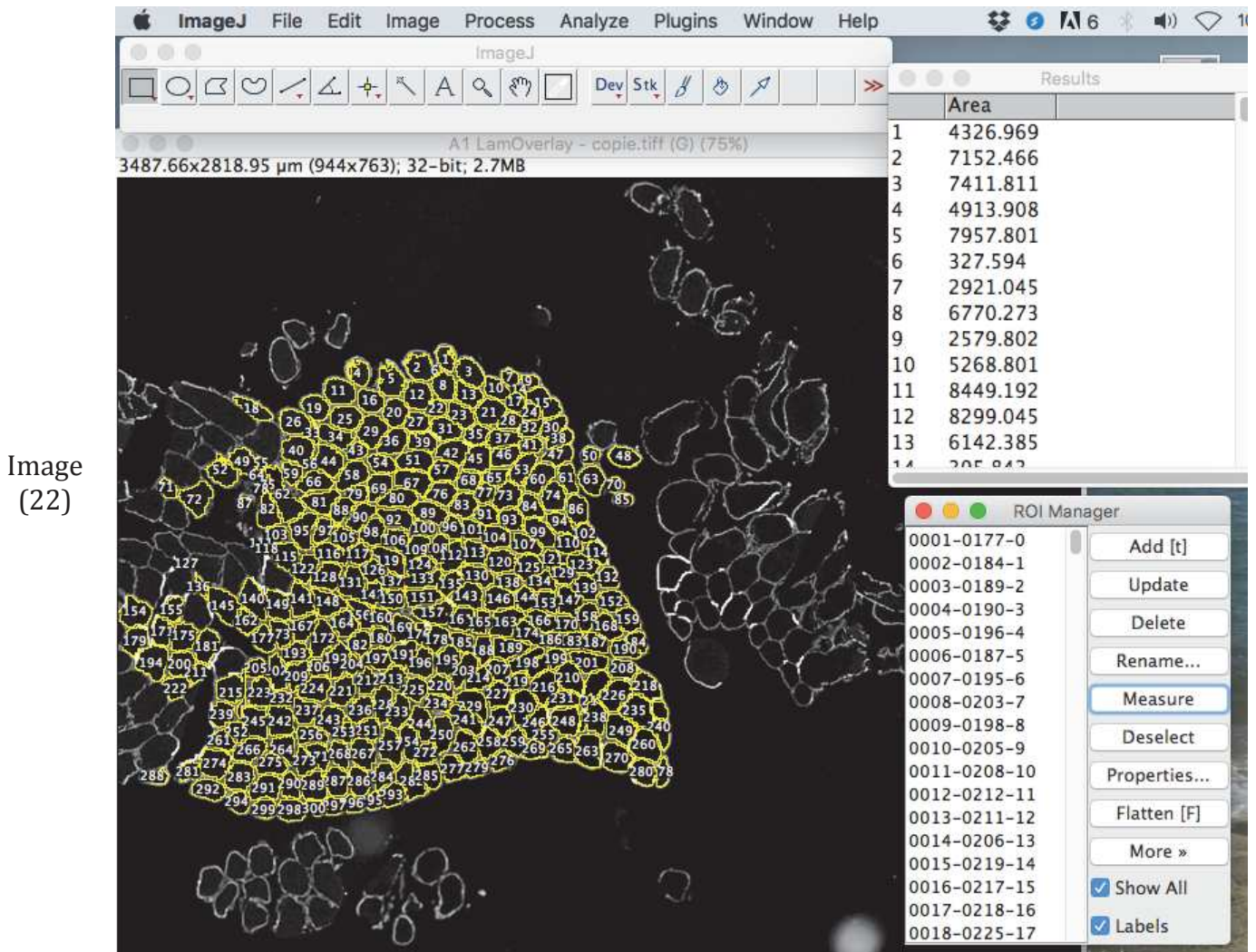


Image (21)

4^{ème} étape : Calcul automatique

Après avoir cliqué sur « OK » de la fenêtre « Analyze Particles », l'image est analysée. 2 nouvelles fenêtres s'ouvrent : « ROI Manager » et « Results ».



Commentaire sur l'image (22) :

- ❖ Chaque rond jaune est une fibre mesurée. Elles sont numérotées dans l'ordre du traitement (de gauche à droite, et de bas en haut).
- ❖ La fenêtre « ROI Manager » stocke les emplacements des fibres mesurées ainsi que leurs numéros.
- ❖ La fenêtre « Results » permet de faire la correspondance entre le numéro de la fibre mesurée et la valeur qui lui est associée. Par exemple, la fibre 1 nommée « 0001-0177-0 » est la fibre numéro 1, qui mesure 4326.969 μm^2 .

Dans la fenêtre « ROI Manager » :

- Show all : permet de montrer la zone d'intérêt mesuré.
- Labels : permet de montrer le numéro de la zone d'intérêt mesuré.

→ Les valeurs calculées sous ImageJ peuvent s'exporter à l'aide d'un simple Copier-Coller dans Excel. Cependant, ImageJ utilise les valeurs avec des points ; tandis que Excel utilise des virgules.

→ N'oubliez pas d'enregistrer votre image pour ne pas perdre les données mesurées.

Liste des communications

Rémi Demangel, Thomas Brioché, Allan Pagano, Coralie Arc-Chagneau, Laurence Pessemesse, Anne Bonnieu, Robin Candau, Guillaume Py & Angèle Chopard. Early functional signature in human after 3 days of dry immersion. 13^{ème} édition de la journée de l'École Doctorale des Sciences du Mouvement Humain (communication affichée), 02 Juin 2017, Montpellier – France.

Rémi Demangel, Loic Treffel, Guillaume Py, Thomas Brioché, Allan F. Pagano, Claude Gharib, Angèle Chopard, Catherine Millet. Early functional signature of human vastus lateralis muscle after 3 days of dry immersion. 37th Annual International Gravitational Physiology Meeting (**Communication orale**) May 28th – June 2st 2017, Zvenigorod-Russie.

Rémi Demangel, Thomas Brioché, Allan F. Pagano, Coralie Arc-Chagneau, Laurence Pessemesse, Anne Bonnieu, Robin Candau, Guillaume Py, Angèle Chopard. Skeletal muscle deconditioning after a short-term dry immersion. (**Communication orale**) Journée CNES jeunes chercheurs (JC2), October 12th-14th, 2016, Toulouse, France.

Rémi Demangel, Thomas Brioché, Allan F. Pagano, Coralie Arc-Chagneau, Laurence Pessemesse, Anne Bonnieu, Robin Candau, Guillaume Py, Angèle Chopard. Skeletal muscle deconditioning after a short-term dry immersion. (**Communication affichée**). Journée CNES jeunes chercheurs (JC2), October 12th-14th, 2016, Toulouse, France.

Demangel Rémi; Treffel Loïc; Bareille Marie-Pierre; Beck Arnaud; Brioché Thomas ; Pagano Allan F.; Candau Robin; Gharib Claude; Py Guillaume; Chopard Angèle. Early skeletal muscle deconditioning after a human 3-day dry immersion. 37h Annual International Gravitational Physiology Meeting (**Communication orale**), June 5th-10th 2016, Toulouse-France.

Anthony Damiot, **Rémi Demangel**, Thomas Brioché, Allan Pagano, François Crampes, Etienne Lefai, Donal O’Gorman, Angèle Chopard, Isabelle Chery, Alexandre Zahariev, Sylvie Normand, Jocelyne Drai, Delphine Collin-Chavagnac, Guillemette Gauquelin-Koch, Michel Prost, Patrick Simon, Guillaume Py, Audrey Bergouignan, Chantal Simon and Stéphane Blanc. A dietary anti-oxidant cocktail supplementation as a new countermeasure against musculo-skeletal system and metabolic alterations induced by physical inactivity in

humans. 37th Annual International Gravitational Physiology Meeting (**Communication orale**), June 5th-10th, 2016, Toulouse-France.

Thomas Brioché, **Rémi Demangel**, Allan F. Pagano, Rémi Roumanille, Mélanie Roche-Subey, Guillaume Py and Angèle Chopard. Molecular aspects of early skeletal muscle deconditioning after a human 3-day dry immersion. 37th Annual International Gravitational Physiology Meeting (**Communication orale**), June 5th-10th, 2016, Toulouse-France.

Pagano, Allan F.; Arc-Chagnaud, Coralie; Brioché, Thomas; **Demangel, Rémi**; Chopard, Angèle; Py, Guillaume. Skeletal muscle regeneration and simulated microgravity: role of inflammation status on muscle fatty infiltration development. 37th Annual International Gravitational Physiology Meeting (**Communication orale**), June 5th-10th 2016, Toulouse-France.

Rémi Demangel, Thomas Brioché, Allan F. Pagano, Marie-Pierre Bareille, Arnaud Beck, Robin Candau, Guillaume Py, Angèle Chopard. Remodeling of skeletal muscle after a short-term inactivity. 12ème Journée de l'École Doctorale des Sciences du Mouvement Humain (JEDSMH) (communication affichée), 27 Mai 2016, Marseille, France.

Allan F. Pagano, Coralie Arc-Chagnaud, Thomas Brioché, **Rémi Demangel**, Angèle Chopard et Guillaume Py. Regeneration of skeletal muscle during chronic inactivity: role of inflammation status on muscle fatty infiltration development. 12ème édition de la journée de l'École Doctorale des Sciences du Mouvement Humain (**Communication orale**), 27 Mai 2016, Marseille-France.

Allan F. Pagano, **Rémi Demangel**, Thomas Brioché, Robin Candau, Claude A. Dechesne, Christian Dani, Anne Bonnieu, Guillaume Py et Angèle Chopard. Muscle regeneration with intermuscular adipose tissue (M. Iwase, Kimura, *et al.*) accumulation is modulated by mechanical constraints. 1ère journée scientifique de l'Institut du Mouvement Humain et Cybernétique (communication affichée), 5 Novembre 2015, Montpellier-France.

Rémi Demangel, Thomas Brioché, Allan Pagano, Robin Candau, Anne Bonnieu, Guillaume Py & Angèle Chopard. Microgravity and prevention of muscle deconditioning. 1ère journée

scientifique de l'Institut du Mouvement Humain et Cybernétique (communication affichée), 5 Novembre 2015, Montpellier-France.

Allan F. Pagano, **Rémi Demangel**, Thomas Brioché, Robin Candau, Anne Bonniou, Guillaume Py et Angèle Chopard. Régénération musculaire, infiltrations graisseuses et effets de l'hypoactivité. 16ème Congrès international de l'Association des Chercheurs en Activités Physiques et Sportives (**Communication orale**), 26-28 Octobre 2015, Nantes – France.

Allan F. Pagano, **Rémi Demangel**, Thomas Brioché, Robin Candau, Claude A. Dechesne, Christian Dani, Anne Bonniou, Guillaume Py et Angèle Chopard. Muscle regeneration with intermuscular adipose tissue accumulation is modulated by the level of mechanical constraints. 36th Annual International Gravitational Physiology Meeting (**Communication orale**), 7 au 12 Juin 2015, Ljubljana-Slovenia.

Thomas Brioché, **Rémi Demangel**, Allan Pagano, Damien Martin, Maria Fernanda Aranda, Rémi Roumanille, Anne Bonniou, Guillaume Py and Angèle Chopard. Beta-hydroxy-beta-methylbutyrate supplementation prevents muscle atrophy and aerobic fitness decrease induced by hindlimb suspension in mice. 36th Annual International Gravitational Physiology Meeting (**Communication orale**) June 7th-12th 2015, Ljubljana-Slovenia.

Allan F. Pagano, **Rémi Demangel**, Thomas Brioché, Robin Candau, Claude A. Dechesne, Christian Dani, Anne Bonniou, Guillaume Py et Angèle Chopard. Unloading inhibits intermuscular adipose tissue accumulation in regenerating mouse skeletal muscle. 11ème édition de la journée de l'École Doctorale des Sciences du Mouvement Humain (communication affichée), 29 Mai 2015, Nice – France.

RÉFÉRENCES

Adams, G. R., Caiozzo, V. J., & Baldwin, K. M. (2003). Skeletal muscle unweighting: spaceflight and ground-based models. *J Appl Physiol (1985)*, *95*(6), 2185-2201. doi:10.1152/jappphysiol.00346.2003

Adams, G. R., Hather, B. M., & Dudley, G. A. (1994). Effect of short-term unweighting on human skeletal muscle strength and size. *Aviat Space Environ Med*, *65*(12), 1116-1121.

Addison, O., Marcus, R. L., Lastayo, P. C., & Ryan, A. S. (2014). Intermuscular fat: a review of the consequences and causes. *Int J Endocrinol*, *2014*, 309570. doi:10.1155/2014/309570

Agyapong-Badu, S., Aird, L., Bailey, L., Mooney, K., Mullix, J., Warner, M., . . . Stokes, M. (2013). Interrater reliability of muscle tone, stiffness and elasticity measurements of rectus femoris and biceps brachii in healthy young and older males. *Working Papers in the Health Sciences*, *1*, 2051-6266.

Aird, L., Samuel, D., & Stokes, M. (2012). Quadriceps muscle tone, elasticity and stiffness in older males: reliability and symmetry using the MyotonPRO. *Arch Gerontol Geriatr*, *55*(2), e31-39. doi:10.1016/j.archger.2012.03.005

Akima, H., Kubo, K., Kanehisa, H., Suzuki, Y., Gunji, A., & Fukunaga, T. (2000). Leg-press resistance training during 20 days of 6 degrees head-down-tilt bed rest prevents muscle deconditioning. *Eur J Appl Physiol*, *82*(1-2), 30-38. doi:10.1007/s004210050648

Akima, H., Kuno, S., Suzuki, Y., Gunji, A., & Fukunaga, T. (1997). Effects of 20 days of bed rest on physiological cross-sectional area of human thigh and leg muscles evaluated by magnetic resonance imaging. *J Gravit Physiol*, *4*(1), S15-21.

Akima, H., Ushiyama, J., Kubo, J., Tonosaki, S., Itoh, M., Kawakami, Y., . . . Fukunaga, T. (2003). Resistance training during unweighting maintains muscle size and function in human calf. *Med Sci Sports Exerc*, *35*(4), 655-662. doi:10.1249/01.MSS.0000058367.66796.35

Alkner, B. A., & Tesch, P. A. (2004a). Efficacy of a gravity-independent resistance exercise device as a countermeasure to muscle atrophy during 29-day bed rest. *Acta Physiol Scand*, 181(3), 345-357. doi:10.1111/j.1365-201X.2004.01293.x

Alkner, B. A., & Tesch, P. A. (2004b). Knee extensor and plantar flexor muscle size and function following 90 days of bed rest with or without resistance exercise. *Eur J Appl Physiol*, 93(3), 294-305. doi:10.1007/s00421-004-1172-8

Ansved, T., & Larsson, L. (1989). Effects of ageing on enzyme-histochemical, morphometrical and contractile properties of the soleus muscle in the rat. *J Neurol Sci*, 93(1), 105-124.

Antonsson, B., Conti, F., Ciavatta, A., Montessuit, S., Lewis, S., Martinou, I., . . . Martinou, J. C. (1997). Inhibition of Bax channel-forming activity by Bcl-2. *Science*, 277(5324), 370-372.

Arciero, P. J., Smith, D. L., & Calles-Escandon, J. (1998). Effects of short-term inactivity on glucose tolerance, energy expenditure, and blood flow in trained subjects. *J Appl Physiol* (1985), 84(4), 1365-1373.

Arentson-Lantz, E. J., English, K. L., Paddon-Jones, D., & Fry, C. S. (2016). Fourteen days of bed rest induces a decline in satellite cell content and robust atrophy of skeletal muscle fibers in middle-aged adults. *J Appl Physiol* (1985), 120(8), 965-975. doi:10.1152/jappphysiol.00799.2015

Atherton, P. J., Greenhaff, P. L., Phillips, S. M., Bodine, S. C., Adams, C. M., & Lang, C. H. (2016). Control of skeletal muscle atrophy in response to disuse: clinical/preclinical contentions and fallacies of evidence. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 311(3), E594-604. doi:10.1152/ajpendo.00257.2016

Baldwin, K. M., Haddad, F., Pandorf, C. E., Roy, R. R., & Edgerton, V. R. (2013). Alterations in muscle mass and contractile phenotype in response to unloading models: role of transcriptional/pretranslational mechanisms. *Front Physiol*, 4, 284. doi:10.3389/fphys.2013.00284

Baldwin, K. M., Herrick, R. E., Ilyina-Kakueva, E., & Oganov, V. S. (1990). Effects of zero gravity on myofibril content and isomyosin distribution in rodent skeletal muscle. *FASEB J*, 4(1), 79-83.

Baum, K., & Essfeld, D. (1999). Origin of back pain during bedrest: A new hypothesis. *Eur J Med Res*, 4(9), 389-393.

Beavers, K. M., Beavers, D. P., Houston, D. K., Harris, T. B., Hue, T. F., Koster, A., . . . Kritchevsky, S. B. (2013). Associations between body composition and gait-speed decline: results from the Health, Aging, and Body Composition study. *Am J Clin Nutr*, 97(3), 552-560. doi:10.3945/ajcn.112.047860

Bechet, D., Tassa, A., Taillandier, D., Combaret, L., & Attaix, D. (2005). Lysosomal proteolysis in skeletal muscle. *Int J Biochem Cell Biol*, 37(10), 2098-2114. doi:10.1016/j.biocel.2005.02.029

Belavy, D. L., Gast, U., Daumer, M., Fomina, E., Rawer, R., Schiessl, H., . . . Felsenberg, D. (2013). Progressive adaptation in physical activity and neuromuscular performance during 520d confinement. *PLoS One*, 8(3), e60090. doi:10.1371/journal.pone.0060090

Berg, H. E., Dudley, G. A., Haggmark, T., Ohlsen, H., & Tesch, P. A. (1991). Effects of lower limb unloading on skeletal muscle mass and function in humans. *J Appl Physiol* (1985), 70(4), 1882-1885.

Berg, H. E., Larsson, L., & Tesch, P. A. (1997). Lower limb skeletal muscle function after 6 wk of bed rest. *J Appl Physiol* (1985), 82(1), 182-188.

Berg, H. E., & Tesch, P. A. (1996). Changes in muscle function in response to 10 days of lower limb unloading in humans. *Acta Physiol Scand*, 157(1), 63-70. doi:10.1046/j.1365-201X.1996.476217000.x

Berg-Johansen, B., Liebenberg, E. C., Li, A., Macias, B. R., Hargens, A. R., & Lotz, J. C. (2016). Spaceflight-induced bone loss alters failure mode and reduces bending strength in murine spinal segments. *J Orthop Res*, 34(1), 48-57. doi:10.1002/jor.23029

Berger, M., Lechner-Steinleitner, S., Kozlovskaya, I., Marosi, M., Mesheriakov, S., Golaszewski, S., & Gersternbrand, F. (2001). *Neurological aspects in real and simulated spaceflight*. Facultas Verlag Wien.

Berry, P., Berry, I., & Manelfe, C. (1993). Magnetic resonance imaging evaluation of lower limb muscles during bed rest--a microgravity simulation model. *Aviat Space Environ Med*, 64(3 Pt 1), 212-218.

Bigard, X., Sanchez, H., Zoll, J., Mateo, P., Rousseau, V., Veksler, V., & Ventura-Clapier, R. (2000). Calcineurin Co-regulates contractile and metabolic components of slow muscle phenotype. *J Biol Chem*, 275(26), 19653-19660. doi:10.1074/jbc.M000430200

Blakemore, S. J., Rickhuss, P. K., Watt, P. W., Rennie, M. J., & Hundal, H. S. (1996). Effects of limb immobilization on cytochrome c oxidase activity and GLUT4 and GLUT5 protein expression in human skeletal muscle. *Clin Sci (Lond)*, 91(5), 591-599.

Bodine, S. C. (2001). Identification of Ubiquitin Ligases Required for Skeletal Muscle Atrophy. *Science*, 294(5547), 1704-1708. doi:10.1126/science.1065874

Bodine, S. C., & Baehr, L. M. (2014a). Skeletal muscle atrophy and the E3 ubiquitin ligases MuRF1 and MAFbx/atrogen-1. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 307(6), E469-484. doi:10.1152/ajpendo.00204.2014

Bodine, S. C., & Baehr, L. M. (2014b). Skeletal Muscle Atrophy and the E3 Ubiquitin Ligases, MuRF1 and MAFbx/Atrogen-1. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. doi:10.1152/ajpendo.00204.2014

Bodine, S. C., Latres, E., Baumhueter, S., Lai, V. K., Nunez, L., Clarke, B. A., . . . Glass, D. J. (2001). Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. *Science*, 294(5547), 1704-1708. doi:10.1126/science.1065874

Bodine, S. C., Stitt, T. N., Gonzalez, M., Kline, W. O., Stover, G. L., Bauerlein, R., . . . Yancopoulos, G. D. (2001). Akt/mTOR pathway is a crucial regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy in vivo. *Nat Cell Biol*, 3(11), 1014-1019. doi:10.1038/ncb1101-1014

Bonaldo, P., & Sandri, M. (2013). Cellular and molecular mechanisms of muscle atrophy. *Dis Model Mech*, 6(1), 25-39. doi:10.1242/dmm.010389

Borina, E., Pellegrino, M. A., D'Antona, G., & Bottinelli, R. (2010). Myosin and actin content of human skeletal muscle fibers following 35 days bed rest. *Scand J Med Sci Sports*, 20(1), 65-73. doi:10.1111/j.1600-0838.2009.01029.x

Bowen, T. S., Schuler, G., & Adams, V. (2015). Skeletal muscle wasting in cachexia and sarcopenia: molecular pathophysiology and impact of exercise training. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*, 6(3), 197-207. doi:10.1002/jcsm.12043

Brioche, T., Pagano, A. F., Py, G., & Chopard, A. (2016). Muscle wasting and aging: Experimental models, fatty infiltrations, and prevention. *Mol Aspects Med*. doi:10.1016/j.mam.2016.04.006

Britto, F. A., Begue, G., Rossano, B., Docquier, A., Vernus, B., Sar, C., . . . Favier, F. B. (2014). REDD1 deletion prevents dexamethasone-induced skeletal muscle atrophy. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, ajpendo 00234 02014. doi:10.1152/ajpendo.00234.2014

Brocca, L., Cannavino, J., Coletto, L., Biolo, G., Sandri, M., Bottinelli, R., & Pellegrino, M. A. (2012). The time course of the adaptations of human muscle proteome to bed rest and the underlying mechanisms. *J Physiol*, 590(20), 5211-5230. doi:10.1113/jphysiol.2012.240267

Caccia, M. R., Harris, J. B., & Johnson, M. A. (1979). Morphology and physiology of skeletal muscle in aging rodents. *Muscle Nerve*, 2(3), 202-212. doi:10.1002/mus.880020308

Caiozzo, V. J., Baker, M. J., & Baldwin, K. M. (1998). Novel transitions in MHC isoforms: separate and combined effects of thyroid hormone and mechanical unloading. *J Appl Physiol (1985)*, 85(6), 2237-2248.

Cancedda, R., Liu, Y., Ruggiu, A., Tavella, S., Biticchi, R., Santucci, D., . . . Pignataro, S. (2012). The Mice Drawer System (MDS) experiment and the space endurance record-breaking mice. *PLoS One*, 7(5), e32243. doi:10.1371/journal.pone.0032243

Carlson, B. M., Billington, L., & Faulkner, J. (1996). Studies on the regenerative recovery of long-term denervated muscle in rats. *Restor Neurol Neurosci*, *10*(2), 77-84. doi:10.3233/RNN-1996-10203

Carnio, S., LoVerso, F., Baraibar, M. A., Longa, E., Khan, M. M., Maffei, M., . . . Sandri, M. (2014). Autophagy impairment in muscle induces neuromuscular junction degeneration and precocious aging. *Cell Rep*, *8*(5), 1509-1521. doi:10.1016/j.celrep.2014.07.061

Caron, A. Z., Haroun, S., Leblanc, E., Trenszt, F., Guindi, C., Amrani, A., & Grenier, G. (2011). The proteasome inhibitor MG132 reduces immobilization-induced skeletal muscle atrophy in mice. *BMC Musculoskelet Disord*, *12*, 185. doi:10.1186/1471-2474-12-185

Casolino, M., Bidoli, V., De Grandis, E., De Pascale, M. P., Furano, G., Morselli, A., . . . Fuglesang, C. (2003). Study of the radiation environment on MIR space station with SILEYE-2 experiment. *Adv Space Res*, *31*(1), 135-140.

Ceylan, O., Seyfettinoglu, F., Dulgeroglu, A. M., Avci, A., Bayram, B., & Bora, O. A. (2014). Histomorphological comparison of immobilization and denervation atrophies. *Acta Orthop Traumatol Turc*, *48*(3), 320-325. doi:10.3944/AOTT.2014.2993

Chiang, G. G., & Abraham, R. T. (2005). Phosphorylation of mammalian target of rapamycin (mTOR) at Ser-2448 is mediated by p70S6 kinase. *J Biol Chem*, *280*(27), 25485-25490. doi:10.1074/jbc.M501707200

Chopard, A., Arrighi, N., Carnino, A., & Marini, J. F. (2005). Changes in dysferlin, proteins from dystrophin glycoprotein complex, costameres, and cytoskeleton in human soleus and vastus lateralis muscles after a long-term bedrest with or without exercise. *FASEB J*, *19*(12), 1722-1724. doi:10.1096/fj.04-3336fje

Chopard, A., Hillock, S., & Jasmin, B. J. (2009). Molecular events and signalling pathways involved in skeletal muscle disuse-induced atrophy and the impact of countermeasures. *J Cell Mol Med*, *13*(9B), 3032-3050. doi:10.1111/j.1582-4934.2009.00864.x

Chopard, A., Lecunff, M., Danger, R., Lamirault, G., Bihouee, A., Teusan, R., . . . Leger, J. J. (2009). Large-scale mRNA analysis of female skeletal muscles during 60 days of bed rest with and without exercise or dietary protein supplementation as countermeasures. *Physiol Genomics*, *38*(3), 291-302. doi:10.1152/physiolgenomics.00036.2009

Chowdhury, P., Long, A., Harris, G., Soulsby, M. E., & Dobretsov, M. (2013). Animal model of simulated microgravity: a comparative study of hindlimb unloading via tail versus pelvic suspension. *Physiol Rep*, *1*(1), e00012. doi:10.1002/phy2.12

Chuang, L. L., Wu, C. Y., & Lin, K. C. (2012). Reliability, validity, and responsiveness of myotonometric measurement of muscle tone, elasticity, and stiffness in patients with stroke. *Arch Phys Med Rehabil*, *93*(3), 532-540. doi:10.1016/j.apmr.2011.09.014

Clement, G., & Pavy-Le Traon, A. (2004). Centrifugation as a countermeasure during actual and simulated microgravity: a review. *Eur J Appl Physiol*, *92*(3), 235-248. doi:10.1007/s00421-004-1118-1

Conley, M. S., Foley, J. M., Ploutz-Snyder, L. L., Meyer, R. A., & Dudley, G. A. (1996). Effect of acute head-down tilt on skeletal muscle cross-sectional area and proton transverse relaxation time. *J Appl Physiol* (1985), *81*(4), 1572-1577.

Convertino, V. A., & Sandler, H. (1995). Exercise countermeasures for spaceflight. *Acta Astronaut*, *35*(4-5), 253-270.

Cros, N., Muller, J., Bouju, S., Pietu, G., Jacquet, C., Leger, J. J., . . . Dechesne, C. A. (1999). Upregulation of M-creatine kinase and glyceraldehyde3-phosphate dehydrogenase: two markers of muscle disuse. *Am J Physiol*, *276*(2 Pt 2), R308-316.

Crosbie, J., Green, T., & Refshauge, K. (1999). Effects of reduced ankle dorsiflexion following lateral ligament sprain on temporal and spatial gait parameters. *Gait Posture*, *9*(3), 167-172.

Csibi, Leibovitch, M. P., Cornille, K., Tintignac, L. A., & Leibovitch, S. A. (2009). MAFbx/Atrogin-1 controls the activity of the initiation factor eIF3-f in skeletal muscle

atrophy by targeting multiple C-terminal lysines. *J Biol Chem*, 284(7), 4413-4421. doi:10.1074/jbc.M807641200

Czabotar, P. E., Lessene, G., Strasser, A., & Adams, J. M. (2014). Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 15(1), 49-63. doi:10.1038/nrm3722

Danial, N. N., & Korsmeyer, S. J. (2004). Cell death: critical control points. *Cell*, 116(2), 205-219.

Dehoux, M., Gobier, C., Lause, P., Bertrand, L., Ketelslegers, J. M., & Thissen, J. P. (2007). IGF-I does not prevent myotube atrophy caused by proinflammatory cytokines despite activation of Akt/Foxo and GSK-3beta pathways and inhibition of atrogin-1 mRNA. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 292(1), E145-150. doi:10.1152/ajpendo.00085.2006

Delbridge, A. R., Grabow, S., Strasser, A., & Vaux, D. L. (2016). Thirty years of BCL-2: translating cell death discoveries into novel cancer therapies. *Nat Rev Cancer*, 16(2), 99-109. doi:10.1038/nrc.2015.17

Delmonico, M. J., Harris, T. B., Visser, M., Park, S. W., Conroy, M. B., Velasquez-Mieyer, P., . . . Goodpaster, B. H. (2009). Longitudinal study of muscle strength, quality, and adipose tissue infiltration. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 90(6), 1579-1585. doi:10.3945/ajcn.2009.28047

Delmonico, M. J., Harris, T. B., Visser, M., Park, S. W., Conroy, M. B., Velasquez-Mieyer, P., . . . Body. (2009). Longitudinal study of muscle strength, quality, and adipose tissue infiltration. *Am J Clin Nutr*, 90(6), 1579-1585. doi:10.3945/ajcn.2009.28047

Demangel, R., Treffel, L., Py, G., Brioché, T., Pagano, A. F., Bareille, M. P., . . . Millet, C. (2017). Early structural and functional signature of 3-day human skeletal muscle disuse using the dry immersion model. *J Physiol*. doi:10.1113/JP273895

Deschenes, M. R., Sherman, E. G., Roby, M. A., Glass, E. K., & Harris, M. B. (2015). Effect of resistance training on neuromuscular junctions of young and aged muscles featuring different recruitment patterns. *J Neurosci Res*, 93(3), 504-513. doi:10.1002/jnr.23495

Desgeorges, M. M., Freyssenet, D., Chanon, S., Castells, J., Pugniere, P., Bechet, D., . . . Defour, A. (2014). Post-transcriptional regulation of autophagy in C2C12 myotubes following starvation and nutrient restoration. *Int J Biochem Cell Biol*, *54*, 208-216. doi:10.1016/j.biocel.2014.07.008

Desplanches, D. (1997). Structural and functional adaptations of skeletal muscle to weightlessness. *Int J Sports Med*, *18 Suppl 4*, S259-264. doi:10.1055/s-2007-972722

di Prampero, P. E., & Narici, M. V. (2003). Muscles in microgravity: from fibres to human motion. *J Biomech*, *36*(3), 403-412.

Dietsch, A. M., Solomon, N. P., Sharkey, L. A., Duffy, J. R., Strand, E. A., & Clark, H. M. (2014). Perceptual and instrumental assessments of orofacial muscle tone in dysarthric and normal speakers. *J Rehabil Res Dev*, *51*(7), 1127-1142. doi:10.1682/JRRD.2013.07.0167

Dijk, D. J., Neri, D. F., Wyatt, J. K., Ronda, J. M., Riel, E., Ritz-De Cecco, A., . . . Czeisler, C. A. (2001). Sleep, performance, circadian rhythms, and light-dark cycles during two space shuttle flights. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, *281*(5), R1647-1664.

Drahota, Z., & Gutmann, E. (1961). The influence of age on the course of reinnervation of muscle. *Gerontologia*, *5*, 88-109.

Dudley, G. A., Duvoisin, M. R., Adams, G. R., Meyer, R. A., Belew, A. H., & Buchanan, P. (1992). Adaptations to unilateral lower limb suspension in humans. *Aviat Space Environ Med*, *63*(8), 678-683.

Dulor, J. P., Cambon, B., Vigneron, P., Reyne, Y., Nougues, J., Casteilla, L., & Bacou, F. (1998). Expression of specific white adipose tissue genes in denervation-induced skeletal muscle fatty degeneration. *FEBS Lett*, *439*(1-2), 89-92.

Dupont-Versteegden, E. E. (2006). Apoptosis in skeletal muscle and its relevance to atrophy. *World J Gastroenterol*, *12*(46), 7463-7466.

Edgerton, V. R., Zhou, M. Y., Ohira, Y., Klitgaard, H., Jiang, B., Bell, G., . . . et al. (1995). Human fiber size and enzymatic properties after 5 and 11 days of spaceflight. *J Appl Physiol (1985)*, 78(5), 1733-1739.

Edstrom, L., & Larsson, L. (1987). Effects of age on contractile and enzyme-histochemical properties of fast- and slow-twitch single motor units in the rat. *J Physiol*, 392, 129-145.

Egan, B., & Zierath, J. R. (2013). Exercise metabolism and the molecular regulation of skeletal muscle adaptation. *Cell Metab*, 17(2), 162-184. doi:10.1016/j.cmet.2012.12.012

Egorov, A. D. (1996). [Qualification of human body reactions to microgravity]. *Aviakosm Ekolog Med*, 30(4), 14-20.

Engel, A. G., Shen, X. M., Selcen, D., & Sine, S. M. (2015). Congenital myasthenic syndromes: pathogenesis, diagnosis, and treatment. *Lancet Neurol*, 14(5), 461. doi:10.1016/S1474-4422(15)00010-1

Epstein, M. (1996). Renal, endocrine and hemodynamic effects of water immersion in humans. In B. C. Fregly MJ (Ed.), *Handbook of physiology* (pp. 845-853). Oxford University, New-York.

Fahim, M. A. (1997). Endurance exercise modulates neuromuscular junction of C57BL/6NNia aging mice. *J Appl Physiol (1985)*, 83(1), 59-66.

Fareed, M. U., Evenson, A. R., Wei, W., Menconi, M., Poylin, V., Petkova, V., . . . Hasselgren, P. O. (2006). Treatment of rats with calpain inhibitors prevents sepsis-induced muscle proteolysis independent of atrogin-1/MAFbx and MuRF1 expression. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 290(6), R1589-1597. doi:10.1152/ajpregu.00668.2005

Farshad, M., Wurgler-Hauri, C. C., Kohler, T., Gerber, C., & Rothenfluh, D. A. (2011). Effect of age on fatty infiltration of supraspinatus muscle after experimental tendon release in rats. *BMC Res Notes*, 4, 530. doi:10.1186/1756-0500-4-530

Ferrando, A. A., Lane, H. W., Stuart, C. A., Davis-Street, J., & Wolfe, R. R. (1996). Prolonged bed rest decreases skeletal muscle and whole body protein synthesis. *Am J Physiol*, 270(4 Pt 1), E627-633.

Ferrando, A. A., Stuart, C. A., Brunder, D. G., & Hillman, G. R. (1995). Magnetic resonance imaging quantitation of changes in muscle volume during 7 days of strict bed rest. *Aviat Space Environ Med*, 66(10), 976-981.

Ferrer-Le-Coeur, F., Mariotti, M., Hivert, P., Satre, E. P., Bouchardeau, F., Courouce, A. M., . . . Lefrere, J. J. (1991). No evidence of HIV-1 infection in seronegative hemophiliacs and in seronegative partners of seropositive hemophiliacs through polymerase chain reaction (PCR) and anti-NEF serology. *Thromb Haemost*, 65(5), 478-482.

Ferretti, G., Berg, H. E., Minetti, A. E., Moia, C., Rampichini, S., & Narici, M. V. (2001). Maximal instantaneous muscular power after prolonged bed rest in humans. *J Appl Physiol* (1985), 90(2), 431-435.

Fitts, R. H., Colloton, P. A., Trappe, S. W., Costill, D. L., Bain, J. L., & Riley, D. A. (2013). Effects of prolonged space flight on human skeletal muscle enzyme and substrate profiles. *J Appl Physiol* (1985), 115(5), 667-679. doi:10.1152/jappphysiol.00489.2013

Fitts, R. H., Riley, D. R., & Widrick, J. J. (2000). Physiology of a microgravity environment invited review: microgravity and skeletal muscle. *J Appl Physiol*, 89(2), 823-839.

Fitts, R. H., Trappe, S. W., Costill, D. L., Gallagher, P. M., Creer, A. C., Colloton, P. A., Riley, D. A. (2010). Prolonged space flight-induced alterations in the structure and function of human skeletal muscle fibres. *J Physiol*, 588(Pt 18), 3567-3592. doi:10.1113/jphysiol.2010.188508

Fomin, I., Orlov, V., Radzevich, A., & Leskin, G., . (1985). Effect of water immersion on indices of central hemodynamics in subjects older than 45 years. *Kosm Biol Aviakosm Med*, 19, 37-40.

Fragala, M. S., Jajtner, A. R., Beyer, K. S., Townsend, J. R., Emerson, N. S., Scanlon, T. C., . . . Stout, J. R. (2014). Biomarkers of muscle quality: N-terminal propeptide of type III procollagen and C-terminal agrin fragment responses to resistance exercise training in older adults. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*, 5(2), 139-148. doi:10.1007/s13539-013-0120-z

Furuno, K., Goodman, M. N., & Goldberg, A. L. (1990). Role of different proteolytic systems in the degradation of muscle proteins during denervation atrophy. *J Biol Chem*, 265(15), 8550-8557.

Gallagher, D., Heshka, S., Kelley, D. E., Thornton, J., Boxt, L., Pi-Sunyer, F. X., . . . Group, M. R. I. A. S. G. o. L. A. R. (2014). Changes in adipose tissue depots and metabolic markers following a 1-year diet and exercise intervention in overweight and obese patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care*, 37(12), 3325-3332. doi:10.2337/dc14-1585

Gamrin, L., Berg, H. E., Essen, P., Tesch, P. A., Hultman, E., Garlick, P. J., . . . Wernerman, J. (1998). The effect of unloading on protein synthesis in human skeletal muscle. *Acta Physiol Scand*, 163(4), 369-377. doi:10.1046/j.1365-201X.1998.t01-1-00391.x

Gavronski, G., Veraksits, A., Vasar, E., & Maaros, J. (2007). Evaluation of viscoelastic parameters of the skeletal muscles in junior triathletes. *Physiol Meas*, 28(6), 625-637. doi:10.1088/0967-3334/28/6/002

Gazenko, O. G., Grigoriev, A. I., & Kozlovskaya, I. B. (1987). Mechanisms of acute and chronic effects of microgravity. *Physiologist*, 30(1 Suppl), S1-5.

Geng, F., Wenzel, S., & Tansey, W. P. (2012). Ubiquitin and Proteasomes in Transcription. *Annu Rev Biochem*. doi:10.1146/annurev-biochem-052110-120012

Glover, E. I., Phillips, S. M., Oates, B. R., Tang, J. E., Tarnopolsky, M. A., Selby, A., . . . Rennie, M. J. (2008). Immobilization induces anabolic resistance in human myofibrillar protein synthesis with low and high dose amino acid infusion. *J Physiol*, 586(24), 6049-6061. doi:10.1113/jphysiol.2008.160333

Goldberg, A. L. (2003). Protein degradation and protection against misfolded or damaged proteins. *Nature*, 426(6968), 895-899. doi:10.1038/nature02263

Gomes, Waddell, D. S., Siu, R., Stein, M., Dewey, S., Furlow, J. D., & Bodine, S. C. (2012). Upregulation of proteasome activity in muscle RING finger 1-null mice following denervation. *FASEB J*, *26*(7), 2986-2999. doi:10.1096/fj.12-204495

Gomes, M. D., Lecker, S. H., Jagoe, R. T., Navon, A., & Goldberg, A. L. (2001). Atrogin-1, a muscle-specific F-box protein highly expressed during muscle atrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *98*(25), 14440-14445. doi:10.1073/pnas.251541198

Goodpaster, B. H., Kelley, D. E., Wing, R. R., Meier, A., & Thaete, F. L. (1999). Effects of weight loss on regional fat distribution and insulin sensitivity in obesity. *Diabetes*, *48*(4), 839-847.

Goodpaster, B. H., Thaete, F. L., & Kelley, D. E. (2000a). Composition of skeletal muscle evaluated with computed tomography. *Ann N Y Acad Sci*, *904*, 18-24.

Goodpaster, B. H., Thaete, F. L., & Kelley, D. E. (2000b). Thigh adipose tissue distribution is associated with insulin resistance in obesity and in type 2 diabetes mellitus. *Am J Clin Nutr*, *71*(4), 885-892.

Greenleaf, J. E. (1984). Physiological responses to prolonged bed rest and fluid immersion in humans. *J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol*, *57*(3), 619-633.

Grigor'ev, A. I., Kozlovskaja, I. B., & Shenkman, B. S. (2004). [The role of support afferents in organisation of the tonic muscle system]. *Russ Fiziol Zh Im I M Sechenova*, *90*(5), 508-521.

Grigor'eva, L. S., & Kozlovskaja, I. B. (1983). [Effect of 7-day immersion hyperkinesia on the response-strength properties of human skeletal muscles]. *Kosm Biol Aviakosm Med*, *17*(4), 21-25.

Grigoriev, A. I., Morukov, B. V., Oganov, V. S., Rakhmanov, A. S., & Buravkova, L. B. (1992). Effect of exercise and bisphosphonate on mineral balance and bone density during 360 day antiorthostatic hypokinesia. *J Bone Miner Res*, *7 Suppl 2*, S449-455. doi:10.1002/jbmr.5650071416

Gritsyna, Y. V., Abdusalamova, Z. R., Vikhlyantsev, I. M., Ulanova, A. D., Shenkman, B. S., Podlubnaya, Z. A., & Kozlovskaya, I. B. (2015). Changes in gene expression and content of Hsp70 and Hsp90 in striated muscles of mice after 30-day space flight on the biosatellite Bion-M1. *Dokl Biochem Biophys*, *463*, 199-202. doi:10.1134/S1607672915040018

Hackney, K. J., & Ploutz-Snyder, L. L. (2012). Unilateral lower limb suspension: integrative physiological knowledge from the past 20 years (1991-2011). *Eur J Appl Physiol*, *112*(1), 9-22. doi:10.1007/s00421-011-1971-7

Hansen, K. B., Vilsboll, T., Bagger, J. I., Holst, J. J., & Knop, F. K. (2011). Increased postprandial GIP and glucagon responses, but unaltered GLP-1 response after intervention with steroid hormone, relative physical inactivity, and high-calorie diet in healthy subjects. *J Clin Endocrinol Metab*, *96*(2), 447-453. doi:10.1210/jc.2010-1605

Hanson, A. M., Harrison, B. C., Young, M. H., Stodieck, L. S., & Ferguson, V. L. (2013). Longitudinal characterization of functional, morphologic, and biochemical adaptations in mouse skeletal muscle with hindlimb suspension. *Muscle Nerve*, *48*(3), 393-402. doi:10.1002/mus.23753

Hargens, A. R., & Vico, L. (2016). Long-duration bed rest as an analog to microgravity. *J Appl Physiol (1985)*, *120*(8), 891-903. doi:10.1152/jappphysiol.00935.2015

Hather, B. M., Adams, G. R., Tesch, P. A., & Dudley, G. A. (1992). Skeletal muscle responses to lower limb suspension in humans. *J Appl Physiol (1985)*, *72*(4), 1493-1498.

Hepple, R. T., & Rice, C. L. (2016). Innervation and neuromuscular control in ageing skeletal muscle. *J Physiol*, *594*(8), 1965-1978. doi:10.1113/JP270561

Hespeel, P., Op't Eijnde, B., Van Leemputte, M., Urso, B., Greenhaff, P. L., Labarque, V., . . . Richter, E. A. (2001). Oral creatine supplementation facilitates the rehabilitation of disuse atrophy and alters the expression of muscle myogenic factors in humans. *J Physiol*, *536*(Pt 2), 625-633.

Hettwer, S., Dahinden, P., Kucsera, S., Farina, C., Ahmed, S., Fariello, R., . . . Vrijbloed, J. W. (2013). Elevated levels of a C-terminal agrin fragment identifies a new subset of sarcopenia patients. *Exp Gerontol*, 48(1), 69-75. doi:10.1016/j.exger.2012.03.002

Holz, M. K., & Blenis, J. (2005). Identification of S6 kinase 1 as a novel mammalian target of rapamycin (mTOR)-phosphorylating kinase. *J Biol Chem*, 280(28), 26089-26093. doi:10.1074/jbc.M504045200

Hoppeler, H. (1986). Exercise-induced ultrastructural changes in skeletal muscle. *Int J Sports Med*, 7(4), 187-204. doi:10.1055/s-2008-1025758

Hortobagyi, T., Dempsey, L., Fraser, D., Zheng, D., Hamilton, G., Lambert, J., & Dohm, L. (2000). Changes in muscle strength, muscle fibre size and myofibrillar gene expression after immobilization and retraining in humans. *J Physiol*, 524 Pt 1, 293-304.

Huang, J., & Forsberg, N. E. (1998). Role of calpain in skeletal-muscle protein degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(21), 12100-12105.

Huang, J., & Zhu, X. (2016). The molecular mechanisms of calpains on muscle atrophy. *Physiol Res*.

Islamov, R. R., Gusev, O. A., Tanabe, A., Terada, M., Tyapkina, O. V., Petrov, K. A., . . . Grigorjev, A. I. (2014). Genomic analysis of mouse lumbar spinal cord after 30-day space flight on biosatellite Bion-M1. *Dokl Biochem Biophys*, 458, 177-178. doi:10.1134/S1607672914050068

Iwase, M., Kimura, K., Sasaki, N., Komagome, R., Ishioka, K., Morimatsu, M., . . . Saito, M. (2000). Canine leptin: cDNA cloning, expression and activity of recombinant protein. *Res Vet Sci*, 68(2), 109-114. doi:10.1053/rvsc.1999.0342

Iwase, S., Sugiyama, Y., Miwa, C., Kamiya, A., Mano, T., Ohira, Y., . . . Kozlovskaya, I. B. (2000). Effects of three days of dry immersion on muscle sympathetic nerve activity and arterial blood pressure in humans. *J Auton Nerv Syst*, 79(2-3), 156-164.

Jamart, C., Raymackers, J. M., Li An, G., Deldicque, L., & Francaux, M. (2011). Prevention of muscle disuse atrophy by MG132 proteasome inhibitor. *Muscle Nerve*, *43*(5), 708-716. doi:10.1002/mus.21949

Jubrias, S. A., Odderson, I. R., Esselman, P. C., & Conley, K. E. (1997). Decline in isokinetic force with age: muscle cross-sectional area and specific force. *Pflugers Arch*, *434*(3), 246-253. doi:10.1007/s004240050392

Jung, C. H., Ro, S.-H., Cao, J., Otto, N. M., & Kim, D.-H. (2010). mTOR regulation of autophagy. *FEBS Lett*, *584*(7), 1287-1295. doi:10.1016/j.febslet.2010.01.017

Kalinkovich, A., & Livshits, G. (2015). Sarcopenia--The search for emerging biomarkers. *Ageing Res Rev*, *22*, 58-71. doi:10.1016/j.arr.2015.05.001

Kaneda, D., Sugie, K., Yamamoto, A., Matsumoto, H., Kato, T., Nonaka, I., & Nishino, I. (2003). A novel form of autophagic vacuolar myopathy with late-onset and multiorgan involvement. *Neurology*, *61*(1), 128-131.

Karampinos, D. C., Baum, T., Nardo, L., Alizai, H., Yu, H., Carballido-Gamio, J., . . . Majumdar, S. (2012). Characterization of the regional distribution of skeletal muscle adipose tissue in type 2 diabetes using chemical shift-based water/fat separation. *J Magn Reson Imaging*, *35*(4), 899-907. doi:10.1002/jmri.23512

Kawakami, Y., Akima, H., Kubo, K., Muraoka, Y., Hasegawa, H., Kouzaki, M., . . . Fukunaga, T. (2001). Changes in muscle size, architecture, and neural activation after 20 days of bed rest with and without resistance exercise. *Eur J Appl Physiol*, *84*(1-2), 7-12. doi:10.1007/s004210000330

Kawashima, S., Akima, H., Kuno, S. Y., Gunji, A., & Fukunaga, T. (2004). Human adductor muscles atrophy after short duration of unweighting. *Eur J Appl Physiol*, *92*(4-5), 602-605. doi:10.1007/s00421-004-1184-4

Khan, M. M., Strack, S., Wild, F., Hanashima, A., Gasch, A., Brohm, K., . . . Rudolf, R. (2014). Role of autophagy, SQSTM1, SH3GLB1, and TRIM63 in the turnover of nicotinic acetylcholine receptors. *Autophagy*, *10*(1), 123-136. doi:10.4161/auto.26841

Kimura, K., Cheng, X. W., Inoue, A., Hu, L., Koike, T., & Kuzuya, M. (2014). beta-Hydroxy-beta-methylbutyrate facilitates PI3K/Akt-dependent mammalian target of rapamycin and FoxO1/3a phosphorylations and alleviates tumor necrosis factor alpha/interferon gamma-induced MuRF-1 expression in C2C12 cells. *Nutr Res*, *34*(4), 368-374. doi:10.1016/j.nutres.2014.02.003

Kirkland, J. L., Tchkonina, T., Pirtskhalava, T., Han, J., & Karagiannides, I. (2002). Adipogenesis and aging: does aging make fat go MAD? *Exp Gerontol*, *37*(6), 757-767.

Klaude, M., Fredriksson, K., Tjader, I., Hammarqvist, F., Ahlman, B., Rooyackers, O., & Wernerman, J. (2007). Proteasome proteolytic activity in skeletal muscle is increased in patients with sepsis. *Clin Sci (Lond)*, *112*(9), 499-506. doi:10.1042/CS20060265

Klionsky, D. J., & Emr, S. D. (2000). Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. *Science*, *290*(5497), 1717-1721.

Knudsen, S. H., Hansen, L. S., Pedersen, M., Dejgaard, T., Hansen, J., Hall, G. V., . . . Krogh-Madsen, R. (2012). Changes in insulin sensitivity precede changes in body composition during 14 days of step reduction combined with overfeeding in healthy young men. *J Appl Physiol (1985)*, *113*(1), 7-15. doi:10.1152/jappphysiol.00189.2011

Kornilova, L. N. (1997). Vestibular function and sensory interaction in altered gravity. *Adv Space Biol Med*, *6*, 275-313.

Kortebein, P., Ferrando, A., Lombeida, J., Wolfe, R., & Evans, W. J. (2007). Effect of 10 days of bed rest on skeletal muscle in healthy older adults. *JAMA*, *297*(16), 1772-1774. doi:10.1001/jama.297.16.1772-b

Kortebein, P., Symons, T. B., Ferrando, A., Paddon-Jones, D., Ronsen, O., Protas, E., . . . Evans, W. J. (2008). Functional impact of 10 days of bed rest in healthy older adults. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, *63*(10), 1076-1081.

Koryak, Y. (1998). Effect of 120 days of bed-rest with and without countermeasures on the mechanical properties of the triceps surae muscle in young women. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol*, *78*(2), 128-135. doi:10.1007/s004210050397

- Kovalenko, E. A., & Gurovsky, N. N. (1980). Hypokinesia. *Medicine, Moscow*.
- Kovanlikaya, A., Guclu, C., Desai, C., Becerra, R., & Gilsanz, V. (2005). Fat quantification using three-point dixon technique: in vitro validation. *Acad Radiol*, *12*(5), 636-639. doi:10.1016/j.acra.2005.01.019
- Kovanlikaya, A., Panigrahy, A., Krieger, M. D., Gonzalez-Gomez, I., Ghugre, N., McComb, J. G., . . . Bluml, S. (2005). Untreated pediatric primitive neuroectodermal tumor in vivo: quantitation of taurine with MR spectroscopy. *Radiology*, *236*(3), 1020-1025. doi:10.1148/radiol.2363040856
- Kozlovskaya, I. B. (2008). [Fundamental and applied objectives of investigations in immersion]. *Aviakosm Ekolog Med*, *42*(5), 3-7.
- Kozlovskaya, I. B., Grigor'eva, L. S., & Gevlich, G. I. (1984). [Comparative analysis of the effect of weightlessness and its model on the velocity-strength properties and tonus of human skeletal muscles]. *Kosm Biol Aviakosm Med*, *18*(6), 22-26.
- Kozlovskaya, I. B. (2002). Countermeasures for long-term space flights, lessons learned from the Russian space program. *J Gravit Physiol*, *9*(1), P313-317.
- Kozlovskaya, I. B. (2007). Gravitational mechanisms in the motor system. . *Natochin YV, Tkatchuk VA*. (Contemporary course of classical physiology. GEOTAR-Media, Moscow.), 115-134.
- Kozlovskaya, I. B., & Kirenskaya, A. V. (1987). Gravitational mechanisms in motor system. Studies in real and simulated weightlessness. *Plenum Press, Massion J (ed) New concepts of motor control.*, 345–350.
- Kozlovskaya, I. B., Kreidich Yu, V., Oganov, V. S., & Koserenko, O. P. (1981). Pathophysiology of motor functions in prolonged manned space flights. *Acta Astronaut*, *8*(9-10), 1059-1072.
- Krainski, F., Hastings, J. L., Heinicke, K., Romain, N., Pacini, E. L., Snell, P. G., . . . Levine, B. D. (2014). The effect of rowing ergometry and resistive exercise on skeletal

muscle structure and function during bed rest. *J Appl Physiol* (1985), 116(12), 1569-1581. doi:10.1152/jappphysiol.00803.2013

Kubo, K., Akima, H., Kouzaki, M., Ito, M., Kawakami, Y., Kanehisa, H., & Fukunaga, T. (2000). Changes in the elastic properties of tendon structures following 20 days bed-rest in humans. *Eur J Appl Physiol*, 83(6), 463-468. doi:10.1007/s004210000309

Kuzel, B. R., Grindel, S., Papandrea, R., & Ziegler, D. (2013). Fatty infiltration and rotator cuff atrophy. *J Am Acad Orthop Surg*, 21(10), 613-623. doi:10.5435/JAAOS-21-10-613

Lagirand-Cantaloube, J., Offner, N., Csibi, A., Leibovitch, M. P., Batonnet-Pichon, S., Tintignac, L. A., . . . Leibovitch, S. A. (2008). The initiation factor eIF3-f is a major target for atrogin1/MAFbx function in skeletal muscle atrophy. *EMBO J*, 27(8), 1266-1276. doi:10.1038/emboj.2008.52

Lang, C. H., Frost, R. A., & Vary, T. C. (2007). Regulation of muscle protein synthesis during sepsis and inflammation. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 293(2), E453-459. doi:10.1152/ajpendo.00204.2007

Leach Huntoon, C., Grigoriev, A. I., & Natochin, Y. (1998). *Fluid and electrolyte regulation in spaceflight* (Vol. 94): Science and technology series, a supplement to advances in the astronautical sciences.

LeBlanc, A., Lin, C., Shackelford, L., Sinitzyn, V., Evans, H., Belichenko, O., . . . Feiback, D. (2000). Muscle volume, MRI relaxation times (T2), and body composition after spaceflight. *J Appl Physiol* (1985), 89(6), 2158-2164.

LeBlanc, A. D., Schneider, V. S., Evans, H. J., Pientok, C., Rowe, R., & Spector, E. (1992). Regional changes in muscle mass following 17 weeks of bed rest. *J Appl Physiol* (1985), 73(5), 2172-2178.

Lecker, S. H., Goldberg, A. L., & Mitch, W. E. (2006). Protein degradation by the ubiquitin-proteasome pathway in normal and disease states. *J Am Soc Nephrol*, 17(7), 1807-1819. doi:10.1681/ASN.2006010083

Lecker, S. H., Jagoe, R. T., Gilbert, A., Gomes, M., Baracos, V., Bailey, J., . . . Goldberg, A. L. (2004). Multiple types of skeletal muscle atrophy involve a common program of changes in gene expression. *FASEB J*, *18*(1), 39-51. doi:10.1096/fj.03-0610com

Levine, B., & Klionsky, D. J. (2004). Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Dev Cell*, *6*(4), 463-477.

Li, Schwartz, R. J., Waddell, I. D., Holloway, B. R., & Reid, M. B. (1998). Skeletal muscle myocytes undergo protein loss and reactive oxygen-mediated NF-kappaB activation in response to tumor necrosis factor alpha. *FASEB J*, *12*(10), 871-880.

Litvinova, K. S., Vikhlyantsev, I. M., Kozlovskaya, I. B., Podlubnaya, Z. A., & Shenkman, B. S. (2004). Effects of artificial support stimulation on fiber and molecular characteristics of soleus muscle in men exposed to 7-day dry immersion. *J Gravit Physiol*, *11*(2), P131-132.

Magee, P., Pearson, S., & Allen, J. (2008). The omega-3 fatty acid, eicosapentaenoic acid (EPA), prevents the damaging effects of tumour necrosis factor (TNF)-alpha during murine skeletal muscle cell differentiation. *Lipids Health Dis*, *7*, 24. doi:10.1186/1476-511X-7-24

Mammucari, C., Milan, G., Romanello, V., Masiero, E., Rudolf, R., Del Piccolo, P., . . . Sandri, M. (2007). FoxO3 controls autophagy in skeletal muscle in vivo. *Cell Metab*, *6*(6), 458-471. doi:10.1016/j.cmet.2007.11.001

Manini, T. M., Clark, B. C., Nalls, M. A., Goodpaster, B. H., Ploutz-Snyder, L. L., & Harris, T. B. (2007). Reduced physical activity increases intermuscular adipose tissue in healthy young adults. *Am J Clin Nutr*, *85*(2), 377-384.

Manning, B., & Cantley, L. C. (2003). Rheb fills a GAP between TSC and TOR. *Trends Biochem Sci*, *28*(11), 573-576. doi:10.1016/j.tibs.2003.09.003

Marcus, R. L., Addison, O., Dibble, L. E., Foreman, K. B., Morrell, G., & Lastayo, P. (2012). Intramuscular adipose tissue, sarcopenia, and mobility function in older individuals. *J Aging Res*, *2012*, 629637. doi:10.1155/2012/629637

Marcus, R. L., Addison, O., Kidde, J. P., Dibble, L. E., & Lastayo, P. C. (2010). Skeletal muscle fat infiltration: impact of age, inactivity, and exercise. *J Nutr Health Aging, 14*(5), 362-366.

Marzetti, E., Calvani, R., Lorenzi, M., Marini, F., D'Angelo, E., Martone, A. M., . . . Landi, F. (2014). Serum levels of C-terminal agrin fragment (CAF) are associated with sarcopenia in older hip fractured patients. *Exp Gerontol, 60*, 79-82. doi:10.1016/j.exger.2014.10.003

Masiero, E., Agatea, L., Mammucari, C., Blaauw, B., Loro, E., Komatsu, M., . . . Sandri, M. (2009). Autophagy is required to maintain muscle mass. *Cell Metab, 10*(6), 507-515. doi:10.1016/j.cmet.2009.10.008

Masiero, E., & Sandri, M. (2010). Autophagy inhibition induces atrophy and myopathy in adult skeletal muscles. *Autophagy, 6*(2), 307-309.

Matsumoto, A., Fujita, N., Arakawa, T., Fujino, H., & Miki, A. (2014). Influence of electrical stimulation on calpain and ubiquitin-proteasome systems in the denervated and unloaded rat tibialis anterior muscles. *Acta Histochem, 116*(5), 936-942. doi:10.1016/j.acthis.2014.03.006

Midrio, M. (2006). The denervated muscle: facts and hypotheses. A historical review. *Eur J Appl Physiol, 98*(1), 1-21. doi:10.1007/s00421-006-0256-z

Miljkovic-Gacic, I., Wang, X., Kammerer, C. M., Gordon, C. L., Bunker, C. H., Kuller, L. H., . . . Zmuda, J. M. (2008). Fat infiltration in muscle: new evidence for familial clustering and associations with diabetes. *Obesity (Silver Spring), 16*(8), 1854-1860. doi:10.1038/oby.2008.280

Miller, T. F., Saenko, I. V., Popov, D. V., Vinogradova, O. L., & Kozlovskaya, I. B. (2004). Effect of mechanical stimulation of the support zones of soles on the muscle stiffness in 7-day dry immersion. *J Gravit Physiol, 11*(2), P135-136.

Mirza, K. A., Pereira, S. L., Edens, N. K., & Tisdale, M. J. (2014). Attenuation of muscle wasting in murine C2C 12 myotubes by epigallocatechin-3-gallate. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*, 5(4), 339-345. doi:10.1007/s13539-014-0139-9

Miyazaki, M., & Esser, K. A. (2009). Cellular mechanisms regulating protein synthesis and skeletal muscle hypertrophy in animals. *J Appl Physiol*, 106(4), 1367-1373. doi:10.1152/jappphysiol.91355.2008

Modak, S., & Banerjee, P. (2004). Studies of left ventricular functions by systolic time intervals on exposure to dry immersion. *Indian J aerospace*, 48, 48-56.

Momken, I., Stevens, L., Bergouignan, A., Desplanches, D., Rudwill, F., Chery, I., . . . Blanc, S. (2011). Resveratrol prevents the wasting disorders of mechanical unloading by acting as a physical exercise mimetic in the rat. *FASEB J*, 25(10), 3646-3660. doi:10.1096/fj.10-177295

Morey-Holton, E. R., & Globus, R. K. (2002). Hindlimb unloading rodent model: technical aspects. *J Appl Physiol* (1985), 92(4), 1367-1377. doi:10.1152/jappphysiol.00969.2001

Mosole, S., Carraro, U., Kern, H., Loeffler, S., Fruhmann, H., Vogelauer, M., . . . Zampieri, S. (2014). Long-term high-level exercise promotes muscle reinnervation with age. *J Neuropathol Exp Neurol*, 73(4), 284-294. doi:10.1097/NEN.0000000000000032

Moukhina, A., Shenkman, B., Blottner, D., Nemirovskaya, T., Lemesheva, Y., Puttmann, B., & Kozlovskaya, I. (2004). Effects of support stimulation on human soleus fiber characteristics during exposure to "dry" immersion. *J Gravit Physiol*, 11(2), P137-138.

Mounier, R., Lantier, L., Leclerc, J., Sotiropoulos, A., Foretz, M., & Viollet, B. (2011). Antagonistic control of muscle cell size by AMPK and mTORC1. *Cell Cycle*, 10(16), 2640-2646.

Moylan, J. S., Smith, J. D., Chambers, M. A., McLoughlin, T. J., & Reid, M. B. (2008). TNF induction of atrogen-1/MAFbx mRNA depends on Foxo4 expression but not AKT-

Foxo1/3 signaling. *Am J Physiol Cell Physiol*, 295(4), C986-993. doi:10.1152/ajpcell.00041.2008

Mueller, P. J., Foley, C. M., & Hasser, E. M. (2005). Hindlimb unloading alters nitric oxide and autonomic control of resting arterial pressure in conscious rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 289(1), R140-147. doi:10.1152/ajpregu.00820.2004

Mukai, R., Nakao, R., Yamamoto, H., Nikawa, T., Takeda, E., & Terao, J. (2010). Quercetin prevents unloading-derived disused muscle atrophy by attenuating the induction of ubiquitin ligases in tail-suspension mice. *J Nat Prod*, 73(10), 1708-1710. doi:10.1021/np100240y

Mulder, E. R., Stegeman, D. F., Gerrits, K. H., Paalman, M. I., Rittweger, J., Felsenberg, D., & de Haan, A. (2006). Strength, size and activation of knee extensors followed during 8 weeks of horizontal bed rest and the influence of a countermeasure. *Eur J Appl Physiol*, 97(6), 706-715. doi:10.1007/s00421-006-0241-6

Murphy, R. A., Reinders, I., Register, T. C., Ayonayon, H. N., Newman, A. B., Satterfield, S., . . . Harris, T. B. (2014). Associations of BMI and adipose tissue area and density with incident mobility limitation and poor performance in older adults. *Am J Clin Nutr*, 99(5), 1059-1065. doi:10.3945/ajcn.113.080796

Murphy, R. M. (2010). Calpains, skeletal muscle function and exercise. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 37(3), 385-391. doi:10.1111/j.1440-1681.2009.05310.x

Nakatogawa, H., Ichimura, Y., & Ohsumi, Y. (2007). Atg8, a ubiquitin-like protein required for autophagosome formation, mediates membrane tethering and hemifusion. *Cell*, 130(1), 165-178. doi:10.1016/j.cell.2007.05.021

Naumenko, V. S., Kulikov, A. V., Kondaurova, E. M., Tsybko, A. S., Kulikova, E. A., Krasnov, I. B., . . . Popova, N. K. (2015). Effect of actual long-term spaceflight on BDNF, TrkB, p75, BAX and BCL-XL genes expression in mouse brain regions. *Neuroscience*, 284, 730-736. doi:10.1016/j.neuroscience.2014.10.045

Navasiolava, N. M., Custaud, M. A., Tomilovskaya, E. S., Larina, I. M., Mano, T., Gauquelin-Koch, G., . . . Kozlovskaya, I. B. (2011). Long-term dry immersion: review and prospects. *Eur J Appl Physiol*, *111*(7), 1235-1260. doi:10.1007/s00421-010-1750-x

Nelson, W. B., Smuder, A. J., Hudson, M. B., Talbert, E. E., & Powers, S. K. (2012). Cross-talk between the calpain and caspase-3 proteolytic systems in the diaphragm during prolonged mechanical ventilation. *Crit Care Med*, *40*(6), 1857-1863. doi:10.1097/CCM.0b013e318246bb5d

Nemirovskaya, T. L., & Shenkman, B. S. (2002). Effect of support stimulation on unloaded soleus in rat. *Eur J Appl Physiol*, *87*(2), 120-126. doi:10.1007/s00421-002-0603-7

Nicogossian, A. E. e. a. (1994). Space physiology and medicine. *Lea & Febiger A Waverly, Philadelphia, 3rd edn.*

Novoselova, E. G., Lunin, S. M., Khrenov, M. O., Parfenyuk, S. B., Novoselova, T. V., Shenkman, B. S., & Fesenko, E. E. (2015). Changes in immune cell signalling, apoptosis and stress response functions in mice returned from the BION-M1 mission in space. *Immunobiology*, *220*(4), 500-509. doi:10.1016/j.imbio.2014.10.021

Ogneva, I. V., Gnyubkin, V., Laroche, N., Maximova, M. V., Larina, I. M., & Vico, L. (2015). Structure of the cortical cytoskeleton in fibers of postural muscles and cardiomyocytes of mice after 30-day 2-g centrifugation. *J Appl Physiol (1985)*, *118*(5), 613-623. doi:10.1152/jappphysiol.00812.2014

Ogneva, I. V., Maximova, M. V., & Larina, I. M. (2014). Structure of cortical cytoskeleton in fibers of mouse muscle cells after being exposed to a 30-day space flight on board the BION-M1 biosatellite. *J Appl Physiol (1985)*, *116*(10), 1315-1323. doi:10.1152/jappphysiol.00134.2014

Paddon-Jones, D., Sheffield-Moore, M., Urban, R. J., Sanford, A. P., Aarsland, A., Wolfe, R. R., & Ferrando, A. A. (2004). Essential amino acid and carbohydrate supplementation ameliorates muscle protein loss in humans during 28 days bedrest. *J Clin Endocrinol Metab*, *89*(9), 4351-4358. doi:10.1210/jc.2003-032159

Pagano, T. B., Wojcik, S., Costagliola, A., De Biase, D., Iovino, S., Iovane, V., . . . Paciello, O. (2015). Age related skeletal muscle atrophy and upregulation of autophagy in dogs. *Vet J*, 206(1), 54-60. doi:10.1016/j.tvjl.2015.07.005

Paul, P. K., Bhatnagar, S., Mishra, V., Srivastava, S., Darnay, B. G., Choi, Y., & Kumar, A. (2012). The E3 ubiquitin ligase TRAF6 intercedes in starvation-induced skeletal muscle atrophy through multiple mechanisms. *Mol Cell Biol*, 32(7), 1248-1259. doi:10.1128/MCB.06351-11

Pavy-Le Traon, A., Heer, M., Narici, M. V., Rittweger, J., & Vernikos, J. (2007). From space to Earth: advances in human physiology from 20 years of bed rest studies (1986-2006). *Eur J Appl Physiol*, 101(2), 143-194. doi:10.1007/s00421-007-0474-z

Phu, S., Boersma, D., & Duque, G. (2015). Exercise and Sarcopenia. *J Clin Densitom*, 18(4), 488-492. doi:10.1016/j.jocd.2015.04.011

Piasecki, M., Ireland, A., Jones, D. A., & McPhee, J. S. (2016). Age-dependent motor unit remodelling in human limb muscles. *Biogerontology*, 17(3), 485-496. doi:10.1007/s10522-015-9627-3

Picquet, F., & Falempin, M. (2003). Compared effects of hindlimb unloading versus terrestrial deafferentation on muscular properties of the rat soleus. *Exp Neurol*, 182(1), 186-194.

Ploutz-Snyder, L. L., Tesch, P. A., Crittenden, D. J., & Dudley, G. A. (1995). Effect of unweighting on skeletal muscle use during exercise. *J Appl Physiol (1985)*, 79(1), 168-175.

Ploutz-Snyder, L. L., Tesch, P. A., Hather, B. M., & Dudley, G. A. (1996). Vulnerability to dysfunction and muscle injury after unloading. *Arch Phys Med Rehabil*, 77(8), 773-777.

Poggesi, C., Tesi, C., & Stehle, R. (2005). Sarcomeric determinants of striated muscle relaxation kinetics. *Pflugers Arch*, 449(6), 505-517. doi:10.1007/s00424-004-1363-5

Popova, N. K., Kulikov, A. V., Kondaurova, E. M., Tsybko, A. S., Kulikova, E. A., Krasnov, I. B., . . . Naumenko, V. S. (2015). Risk neurogenes for long-term spaceflight:

dopamine and serotonin brain system. *Mol Neurobiol*, 51(3), 1443-1451. doi:10.1007/s12035-014-8821-7

Proshchina, A. E., Krivova, Y. S., & Saveliev, S. C. (2015). Pancreas of C57 black mice after long-term space flight (Bion-M1 Space Mission). *Life Sci Space Res (Amst)*, 7, 22-26. doi:10.1016/j.lssr.2015.09.001

Pruyn, E. C., Watsford, M. L., & Murphy, A. J. (2015). Validity and reliability of three methods of stiffness assessment. *Journal of Sport and Health Science*, 5, 476-483. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.jshs.2015.12.001

Purintrapiban, J., Wang, M. C., & Forsberg, N. E. (2003). Degradation of sarcomeric and cytoskeletal proteins in cultured skeletal muscle cells. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 136(3), 393-401.

Py, G., Ramonatxo, C., Sirvent, P., Sanchez, A. M., Philippe, A. G., Douillard, A., . . . Candau, R. B. (2015). Chronic clenbuterol treatment compromises force production without directly altering skeletal muscle contractile machinery. *J Physiol*, 593(8), 2071-2084. doi:10.1113/jphysiol.2014.287060

Reschke, M. F., Bloomberg, J. J., Paloski, W. H., Mulavara, A. P., Feiveson, A. H., & Harm, D. L. (2009). Postural reflexes, balance control, and functional mobility with long-duration head-down bed rest. *Aviat Space Environ Med*, 80(5 Suppl), A45-54.

Roberts, P., Moshitch-Moshkovitz, S., Kvam, E., O'Toole, E., Winey, M., & Goldfarb, D. S. (2003). Piecemeal microautophagy of nucleus in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell*, 14(1), 129-141. doi:10.1091/mbc.E02-08-0483

Roffino, S., Carnino, A., Charpiot, P., & Marini, J. F. (1998). Increase in rat soleus myotendinous interface after a 14-d spaceflight. *C R Acad Sci III*, 321(7), 557-564.

Rudnick, J., Puttmann, B., Tesch, P. A., Alkner, B., Schoser, B. G., Salanova, M., . . . Blottner, D. (2004). Differential expression of nitric oxide synthases (NOS 1-3) in human skeletal muscle following exercise countermeasure during 12 weeks of bed rest. *FASEB J*, 18(11), 1228-1230. doi:10.1096/fj.03-0792fje

Rudolf, R., Bogomolovas, J., Strack, S., Choi, K. R., Khan, M. M., Wagner, A., . . . Labeit, S. (2013). Regulation of nicotinic acetylcholine receptor turnover by MuRF1 connects muscle activity to endo/lysosomal and atrophy pathways. *Age (Dordr)*, *35*(5), 1663-1674. doi:10.1007/s11357-012-9468-9

Rudolf, R., Deschenes, M. R., & Sandri, M. (2016). Neuromuscular junction degeneration in muscle wasting. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, *19*(3), 177-181. doi:10.1097/MCO.0000000000000267

Rudolf, R., Khan, M. M., Labeit, S., & Deschenes, M. R. (2014). Degeneration of neuromuscular junction in age and dystrophy. *Front Aging Neurosci*, *6*, 99. doi:10.3389/fnagi.2014.00099

Russell, R. C., Tian, Y., Yuan, H., Park, H. W., Chang, Y. Y., Kim, J., . . . Guan, K. L. (2013). ULK1 induces autophagy by phosphorylating Beclin-1 and activating VPS34 lipid kinase. *Nat Cell Biol*, *15*(7), 741-750. doi:10.1038/ncb2757

Sandona, D., Desaphy, J. F., Camerino, G. M., Bianchini, E., Ciciliot, S., Danieli-Betto, D., . . . Schiaffino, S. (2012). Adaptation of mouse skeletal muscle to long-term microgravity in the MDS mission. *PLoS One*, *7*(3), e33232. doi:10.1371/journal.pone.0033232

Sandri, M. (2010). Autophagy in skeletal muscle. *FEBS Lett*, *584*(7), 1411-1416. doi:10.1016/j.febslet.2010.01.056

Sandri, M. (2013). Protein breakdown in muscle wasting: role of autophagy-lysosome and ubiquitin-proteasome. *Int J Biochem Cell Biol*, *45*(10), 2121-2129. doi:10.1016/j.biocel.2013.04.023

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

Sato, S., Ogura, Y., & Kumar, A. (2014). TWEAK/Fn14 Signaling Axis Mediates Skeletal Muscle Atrophy and Metabolic Dysfunction. *Front Immunol*, *5*, 18. doi:10.3389/fimmu.2014.00018

Schakman, O., Kalista, S., Barbe, C., Loumaye, A., & Thissen, J. P. (2013). Glucocorticoid-induced skeletal muscle atrophy. *Int J Biochem Cell Biol*, 45(10), 2163-2172. doi:10.1016/j.biocel.2013.05.036

Scheld, K., Zittermann, A., Heer, M., Herzog, B., Mika, C., Drummer, C., & Stehle, P. (2001). Nitrogen metabolism and bone metabolism markers in healthy adults during 16 weeks of bed rest. *Clin Chem*, 47(9), 1688-1695.

Schiaffino, S., Dyar, K. A., Ciciliot, S., Blaauw, B., & Sandri, M. (2013). Mechanisms regulating skeletal muscle growth and atrophy. *FEBS J*, 280(17), 4294-4314. doi:10.1111/febs.12253

Schneider, S., Peipsi, A., Stokes, M., Knicker, A., & Abeln, V. (2015). Feasibility of monitoring muscle health in microgravity environments using Myoton technology. *Med Biol Eng Comput*, 53(1), 57-66. doi:10.1007/s11517-014-1211-5

Schulze, K., Gallagher, P., & Trappe, S. (2002). Resistance training preserves skeletal muscle function during unloading in humans. *Med Sci Sports Exerc*, 34(2), 303-313.

Sciorati, C., Clementi, E., Manfredi, A. A., & Rovere-Querini, P. (2015). Fat deposition and accumulation in the damaged and inflamed skeletal muscle: cellular and molecular players. *Cell Mol Life Sci*. doi:10.1007/s00018-015-1857-7

Shenkman, B. S., Kozlovskaya, I. B., Nemirovskaya, T. L., & Tcheglova, I. A. (1997). Human muscle atrophy in supportlessness: effects of short-term exposure to dry immersion. *J Gravit Physiol*, 4(2), P137-138.

Shenkman, B. S., Litvinova, K. S., Nemirovskaya, T. L., Podlubnaya, Z. A., Vikhlyantsev, I. M., & Kozlovskaya, I. B. (2004). Afferent and peripheral control of muscle fiber properties during gravitational unloading. *J Gravit Physiol*, 11(2), P111-114.

Shenkman, B. S., Podlubnaia, Z. A., Vikhlyantsev, I. M., Litvinova, K. S., Udaltsov, S. N., Nemirovskaia, T. L., . . . Kozlovskaiia, I. B. (2004). [Human soleus fibers contractile characteristics and sarcomeric cytoskeletal proteins after gravitational unloading. Contribution of support stimulus]. *Biofizika*, 49(5), 881-890.

Shul'zhenko, E. B., Kozlova, V. G., Aleksandrova, E. A., & Kudrin, K. A. (1984). [Adaptive effects of repeated immersion exposure on the human body]. *Kosm Biol Aviakosm Med*, 18(2), 57-59.

Shulzhenko, E., Vil-Vilyams, I. F., Khudyakova, M. A., & A.I., G. (1976). Deconditioning during prolonged immersion and possible countermeasures. *Life Sci Space Res*, 14, 289-294.

Shulzhenko, E., Vil-Vilyams, IF. (1975a). *Simulation of the human body deconditioning with the method of "dry" immersion*.

Shulzhenko, E. B. (1975b). Human sensitivity to gravity (on the problem of gravipreferendum). *Life Sci Space Res*, 13, 3-9.

Smith, G. I., Atherton, P., Reeds, D. N., Mohammed, B. S., Rankin, D., Rennie, M. J., & Mittendorfer, B. (2011). Dietary omega-3 fatty acid supplementation increases the rate of muscle protein synthesis in older adults: a randomized controlled trial. *Am J Clin Nutr*, 93(2), 402-412. doi:10.3945/ajcn.110.005611

Smith, H. K., Maxwell, L., Martyn, J. A., & Bass, J. J. (2000). Nuclear DNA fragmentation and morphological alterations in adult rabbit skeletal muscle after short-term immobilization. *Cell Tissue Res*, 302(2), 235-241.

Sofronova, S. I., Tarasova, O. S., Gaynullina, D., Borzykh, A. A., Behnke, B. J., Stabley, J. N., . . . Delp, M. D. (2015). Spaceflight on the Bion-M1 biosatellite alters cerebral artery vasomotor and mechanical properties in mice. *J Appl Physiol (1985)*, 118(7), 830-838. doi:10.1152/jappphysiol.00976.2014

Somody, L., El Fazaa, S., Gharbi, N., Gharib, C., & Gauquelin-Koch, G. (1999). Immersion physiology: a current look at an ancient treatment. *Presse Thermale et Climatique*, 136, 181-187.

Soni, N. K., Ross, A. B., Scheers, N., Savolainen, O. I., Nookaew, I., Gabrielsson, B. G., & Sandberg, A. S. (2016). Eicosapentaenoic and Docosahexaenoic Acid-Enriched High Fat Diet Delays Skeletal Muscle Degradation in Mice. *Nutrients*, 8(9). doi:10.3390/nu8090543

Stehle, R., Kruger, M., & Pfitzer, G. (2002). Force kinetics and individual sarcomere dynamics in cardiac myofibrils after rapid Ca^{2+} changes. *Biophys J*, 83(4), 2152-2161. doi:10.1016/S0006-3495(02)73975-1

Stehle, R., Kruger, M., Scherer, P., Brixius, K., Schwinger, R. H., & Pfitzer, G. (2002). Isometric force kinetics upon rapid activation and relaxation of mouse, guinea pig and human heart muscle studied on the subcellular myofibrillar level. *Basic Res Cardiol*, 97 Suppl 1, I127-135.

Stein, T. P., Leskiw, M. J., Schluter, M. D., Donaldson, M. R., & Larina, I. (1999). Protein kinetics during and after long-duration spaceflight on MIR. *Am J Physiol*, 276(6 Pt 1), E1014-1021.

Stevens, L., Bastide, B., Bozzo, C., & Mounier, Y. (2004). Hybrid fibres under slow-to-fast transformations: expression is of myosin heavy and light chains in rat soleus muscle. *Pflugers Arch*, 448(5), 507-514. doi:10.1007/s00424-004-1287-0

Stevens, L., Bastide, B., Kischel, P., Pette, D., & Mounier, Y. (2002). Time-dependent changes in expression of troponin subunit isoforms in unloaded rat soleus muscle. *Am J Physiol Cell Physiol*, 282(5), C1025-1030. doi:10.1152/ajpcell.00252.2001

Stevenson, E. J., Koncarevic, A., Giresi, P. G., Jackman, R. W., & Kandarian, S. C. (2005). Transcriptional profile of a myotube starvation model of atrophy. *J Appl Physiol (1985)*, 98(4), 1396-1406. doi:10.1152/jappphysiol.01055.2004

Struhal, W., Berger, M., Gerstenbrand, F., Golaszewki, S., & Lechner-Steinleitner, S. (2002, 8-9 October 2002). [Changes of reflex amplitude in dry water immersion].

Suetta, C., Frandsen, U., Jensen, L., Jensen, M. M., Jespersen, J. G., Hvid, L. G., . . . Kjaer, M. (2012). Aging affects the transcriptional regulation of human skeletal muscle disuse atrophy. *PLoS One*, 7(12), e51238. doi:10.1371/journal.pone.0051238

Tagliaferri, C., Wittrant, Y., Davicco, M. J., Walrand, S., & Coxam, V. (2015). Muscle and bone, two interconnected tissues. *Ageing Res Rev*, 21, 55-70. doi:10.1016/j.arr.2015.03.002

Tawa, N. E., Jr., Odessey, R., & Goldberg, A. L. (1997). Inhibitors of the proteasome reduce the accelerated proteolysis in atrophying rat skeletal muscles. *J Clin Invest*, *100*(1), 197-203. doi:10.1172/JCI119513

Tesch, P. A., Lundberg, T. R., & Fernandez Gonzalo, R. (2016). Unilateral lower limb suspension (ULLS): from subject selection to "omic" responses. *J Appl Physiol (1985)*, jap 01052 02015. doi:10.1152/jappphysiol.01052.2015

Tesi, C., Colomo, F., Piroddi, N., & Poggesi, C. (2002). Characterization of the cross-bridge force-generating step using inorganic phosphate and BDM in myofibrils from rabbit skeletal muscles. *J Physiol*, *541*(Pt 1), 187-199.

Tesi, C., Piroddi, N., Colomo, F., & Poggesi, C. (2002). Relaxation kinetics following sudden Ca(2+) reduction in single myofibrils from skeletal muscle. *Biophys J*, *83*(4), 2142-2151. doi:10.1016/S0006-3495(02)73974-X

Thissen, J. P. (2005). Towards an understanding of molecular mechanisms of muscle atrophy. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, *8*(3), 245-247; discussion 271-245.

Thom, J. M., Thompson, M. W., Ruell, P. A., Bryant, G. J., Fonda, J. S., Harmer, A. R., . . . Hunter, S. K. (2001). Effect of 10-day cast immobilization on sarcoplasmic reticulum calcium regulation in humans. *Acta Physiol Scand*, *172*(2), 141-147. doi:10.1046/j.1365-201X.2001.00853.x

Thompson, M. G., Thom, A., Partridge, K., Garden, K., Campbell, G. P., Calder, G., & Palmer, R. M. (1999). Stimulation of myofibrillar protein degradation and expression of mRNA encoding the ubiquitin-proteasome system in C(2)C(12) myotubes by dexamethasone: effect of the proteasome inhibitor MG-132. *J Cell Physiol*, *181*(3), 455-461. doi:10.1002/(SICI)1097-4652(199912)181:3<455::AID-JCP9>3.0.CO;2-K

Tiao, G., Hobler, S., Wang, J. J., Meyer, T. A., Luchette, F. A., Fischer, J. E., & Hasselgren, P. O. (1997). Sepsis is associated with increased mRNAs of the ubiquitin-proteasome proteolytic pathway in human skeletal muscle. *J Clin Invest*, *99*(2), 163-168. doi:10.1172/JCI119143

Tintignac, L. A., Brenner, H. R., & Ruegg, M. A. (2015). Mechanisms Regulating Neuromuscular Junction Development and Function and Causes of Muscle Wasting. *Physiol Rev*, 95(3), 809-852. doi:10.1152/physrev.00033.2014

Trappe, S., Costill, D., Gallagher, P., Creer, A., Peters, J. R., Evans, H., . . . Fitts, R. H. (2009). Exercise in space: human skeletal muscle after 6 months aboard the International Space Station. *J Appl Physiol* (1985), 106(4), 1159-1168. doi:10.1152/jappphysiol.91578.2008

Trappe, S., Trappe, T., Gallagher, P., Harber, M., Alkner, B., & Tesch, P. (2004). Human single muscle fibre function with 84 day bed-rest and resistance exercise. *J Physiol*, 557(Pt 2), 501-513. doi:10.1113/jphysiol.2004.062166

Treffel, L., Dmitrieva, L., Gauquelin-Koch, G., Custaud, M. A., Blanc, S., Gharib, C., & Millet, C. (2016). Craniomandibular System and Postural Balance after 3-Day Dry Immersion. *PLoS One*, 11(2), e0150052. doi:10.1371/journal.pone.0150052

Treffel, L., Mkhitarian, K., Gellee, S., Gauquelin-Koch, G., Gharib, C., Blanc, S., & Millet, C. (2016). Intervertebral Disc Swelling Demonstrated by 3D and Water Content Magnetic Resonance Analyses after a 3-Day Dry Immersion Simulating Microgravity. *Frontiers in Physiology*, 7(605). doi:10.3389/fphys.2016.00605

Tsybko, A. S., Ilchibaeva, T. V., Kulikov, A. V., Kulikova, E. A., Krasnov, I. B., Sychev, V. N., . . . Naumenko, V. S. (2015). Effect of microgravity on glial cell line-derived neurotrophic factor and cerebral dopamine neurotrophic factor gene expression in the mouse brain. *J Neurosci Res*, 93(9), 1399-1404. doi:10.1002/jnr.23600

Tuttle, L. J., Sinacore, D. R., & Mueller, M. J. (2012). Intermuscular adipose tissue is muscle specific and associated with poor functional performance. *J Aging Res*, 2012, 172957. doi:10.1155/2012/172957

Uezumi, A., Ikemoto-Uezumi, M., & Tsuchida, K. (2014). Roles of nonmyogenic mesenchymal progenitors in pathogenesis and regeneration of skeletal muscle. *Front Physiol*, 5, 68. doi:10.3389/fphys.2014.00068

Uezumi, A., Ito, T., Morikawa, D., Shimizu, N., Yoneda, T., Segawa, M., . . . Fukada, S. (2011). Fibrosis and adipogenesis originate from a common mesenchymal progenitor in skeletal muscle. *J Cell Sci*, *124*(Pt 21), 3654-3664. doi:10.1242/jcs.086629

Ulanova, A., Gritsyna, Y., Vikhlyantsev, I., Salmov, N., Bobylev, A., Abdusalamova, Z., . . . Podlubnaya, Z. (2015). Isoform composition and gene expression of thick and thin filament proteins in striated muscles of mice after 30-day space flight. *Biomed Res Int*, *2015*, 104735. doi:10.1155/2015/104735

Valdez, G., Tapia, J. C., Kang, H., Clemenson, G. D., Jr., Gage, F. H., Lichtman, J. W., & Sanes, J. R. (2010). Attenuation of age-related changes in mouse neuromuscular synapses by caloric restriction and exercise. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *107*(33), 14863-14868. doi:10.1073/pnas.1002220107

van Norren, K., Rusli, F., van Dijk, M., Lute, C., Nagel, J., Dijk, F. J., . . . Steegenga, W. T. (2015). Behavioural changes are a major contributing factor in the reduction of sarcopenia in caloric-restricted ageing mice. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*, *6*(3), 253-268. doi:10.1002/jcsm.12024

Van Ombergen, A., Wuyts, F. L., Jeurissen, B., Sijbers, J., Vanhevel, F., Jillings, S., . . . Demertzi, A. (2017). Intrinsic functional connectivity reduces after first-time exposure to short-term gravitational alterations induced by parabolic flight. *Sci Rep*, *7*(1), 3061. doi:10.1038/s41598-017-03170-5

Veldhuizen, J. W., Verstappen, F. T., Vroemen, J. P., Kuipers, H., & Greep, J. M. (1993). Functional and morphological adaptations following four weeks of knee immobilization. *Int J Sports Med*, *14*(5), 283-287. doi:10.1055/s-2007-1021178

Verduyckt, I., Remacle, M., Jamart, J., Benderitter, C., & Morsomme, D. (2011). Voice-related complaints in the pediatric population. *J Voice*, *25*(3), 373-380. doi:10.1016/j.jvoice.2009.11.008

Vernikos, J., & Schneider, V. S. (2010). Space, gravity and the physiology of aging: parallel or convergent disciplines? A mini-review. *Gerontology*, *56*(2), 157-166. doi:10.1159/000252852

Vettor, R., Milan, G., Franzin, C., Sanna, M., De Coppi, P., Rizzuto, R., & Federspil, G. (2009). The origin of intermuscular adipose tissue and its pathophysiological implications. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, *297*(5), E987-998. doi:10.1152/ajpendo.00229.2009

Vinogradova, O. L., Popov, D. V., Saenko, I. V., & Kozlovskaya, I. B. (2002). Muscle transverse stiffness and venous compliance under conditions of simulated supportlessness. *J Gravit Physiol*, *9*(1), P327-329.

Visser, M., Goodpaster, B. H., Kritchevsky, S. B., Newman, A. B., Nevitt, M., Rubin, S. M., . . . Harris, T. B. (2005). Muscle mass, muscle strength, and muscle fat infiltration as predictors of incident mobility limitations in well-functioning older persons. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, *60*(3), 324-333.

Visser, M., Kritchevsky, S. B., Goodpaster, B. H., Newman, A. B., Nevitt, M., Stamm, E., & Harris, T. B. (2002). Leg muscle mass and composition in relation to lower extremity performance in men and women aged 70 to 79: the health, aging and body composition study. *J Am Geriatr Soc*, *50*(5), 897-904.

Vucic, D. (2013). The Role of Ubiquitination in TWEAK-Stimulated Signaling. *Front Immunol*, *4*, 472. doi:10.3389/fimmu.2013.00472

Wall, B. T., Dirks, M. L., & van Loon, L. J. (2013). Skeletal muscle atrophy during short-term disuse: implications for age-related sarcopenia. *Ageing Res Rev*, *12*(4), 898-906. doi:10.1016/j.arr.2013.07.003

Wang, L., Luo, G. J., Wang, J. J., & Hasselgren, P. O. (1998). Dexamethasone stimulates proteasome- and calcium-dependent proteolysis in cultured L6 myotubes. *Shock*, *10*(4), 298-306.

Watenpaugh, D. E., & Hargens, A. R. (1996). The cardiovascular system in microgravity. In B. C. Fregly MJ (Ed.), *Handbook of physiology* (pp. 631-674). Oxford University Press, New-York.

Widrick, J. J., Trappe, S. W., Romatowski, J. G., Riley, D. A., Costill, D. L., & Fitts, R. H. (2002). Unilateral lower limb suspension does not mimic bed rest or spaceflight effects on human muscle fiber function. *J Appl Physiol* (1985), 93(1), 354-360. doi:10.1152/jappphysiol.01245.2001

Williams, D., Kuipers, A., Mukai, C., & Thirsk, R. (2009). Acclimation during space flight: effects on human physiology. *CMAJ*, 180(13), 1317-1323. doi:10.1503/cmaj.090628

Zhang, L., Tang, H., Kou, Y., Li, R., Zheng, Y., Wang, Q., . . . Jin, L. (2013). MG132-mediated inhibition of the ubiquitin-proteasome pathway ameliorates cancer cachexia. *J Cancer Res Clin Oncol*, 139(7), 1105-1115. doi:10.1007/s00432-013-1412-6

Zhao, J., Brault, J. J., Schild, A., Cao, P., Sandri, M., Schiaffino, S., . . . Goldberg, A. L. (2007). FoxO3 coordinately activates protein degradation by the autophagic/lysosomal and proteasomal pathways in atrophying muscle cells. *Cell Metab*, 6(6), 472-483. doi:10.1016/j.cmet.2007.11.004

Zhou, M. Y., Klitgaard, H., Saltin, B., Roy, R. R., Edgerton, V. R., & Gollnick, P. D. (1995). Myosin heavy chain isoforms of human muscle after short-term spaceflight. *J Appl Physiol* (1985), 78(5), 1740-1744.

Zwart, S. R., Pierson, D., Mehta, S., Gonda, S., & Smith, S. M. (2010). Capacity of omega-3 fatty acids or eicosapentaenoic acid to counteract weightlessness-induced bone loss by inhibiting NF-kappaB activation: from cells to bed rest to astronauts. *J Bone Miner Res*, 25(5), 1049-1057. doi:10.1359/jbmr.091041

RESUME

Depuis des décennies, l'un des enjeux des sciences de l'espace est d'accompagner les astronautes lors de leur séjour de courte ou longue durée, principalement en vols orbitaux à bord d'une station spatiale. Dans ce contexte, nos travaux participent à la compréhension du déconditionnement musculaire associé à un séjour en impesanteur et à l'évaluation des différentes contremesures.

Que ce soit dans le secteur spatial ou celui de la santé, les scientifiques ont eu l'opportunité d'étudier les effets de la réduction chronique d'activité et de l'impesanteur, grâce à différents modèles expérimentaux qui sont présentés dans le chapitre 1. La partie 1 fait également l'état des lieux des paramètres du déconditionnement musculaire, que sont principalement la perte de masse et de force musculaire. Ces deux paramètres apparaissent de manière précoce dans une situation d'hypoactivité et ne sont pas corrélés au cours du temps, ce qui se traduit par une diminution de force de plus grande amplitude que les degrés d'atrophie rapportés. Parmi les facteurs explicatifs de cette disproportion, l'accumulation accrue d'infiltrations graisseuses et la dénervation sont des éléments explicatifs et ont également fait l'objet de nos expérimentations.

Nos travaux ont pour objectif principal de caractériser les altérations précoces du muscle strié squelettique à l'aide d'un modèle d'impesanteur simulée, appelé immersion sèche ou Dry Immersion (DI). Ce modèle est reconnu depuis plusieurs années par les scientifiques russes pour être plus sévère que l'alitement prolongé et a été mis en place il y a quelques années pour la première fois en Europe (Toulouse). L'étude a consisté à placer 12 bénévoles masculins sains en immersion sèche pendant 3 jours. Cette première étude menée en Europe nous a permis de caractériser les changements précoces du déconditionnement musculaire au niveau structural et fonctionnel. Les biopsies musculaires pre- et post-DI, obtenues à partir du muscle *Vastus Lateralis* ont permis de quantifier par immunohistologie le degré d'atrophie musculaire par type de fibre, et d'analyser les changements myotypologiques. Au niveau structural, nous avons rapporté par IRM une diminution de 10% du volume du quadriceps, ainsi qu'une atrophie de 10%, principalement attribuée aux fibres de type 1. Dès 3 jours, le pourcentage de fibres exprimant des MyHC 1 a également diminué, alors qu'on relève en parallèle une apparition de fibres hybrides (+1.3%). Au niveau fonctionnel, la perte de force musculaire est de 11%, et nous relevons une altération des propriétés viscoélastique du rectus femoris. Au niveau moléculaire, l'expression de protéines clés impliquées dans la régulation de la balance protéique rapporte par exemple une augmentation précoce de l'expression de l'atrogène MURF1 (+41%) et une diminution de l'expression de 4EBP1 (-17%). Une analyse transcriptomique par RNA-seq a également mis en valeur un changement d'expression significatif de 2872 gènes.

Une seconde étude nous a permis d'évaluer les effets d'un cocktail anti-oxydant, anti-inflammatoire comme contremesure lors d'une réduction d'activité de 20 jours et lors d'un bed rest de 2 mois. Des biopsies musculaires pre- et post-DI et BR ont été obtenues à partir du muscle *Vastus Lateralis* et rapportent un degré d'atrophie d'environ 20% dans les deux protocoles. La contremesure a principalement montré un effet protecteur sur les fibres de type IIa. L'analyse des E3 ligases MuRF-1 et Atrogin-1, n'indique aucune modification dans les deux protocoles de longue durée.

Les résultats de nos études à courts et longs termes du déconditionnement musculaire soulignent les changements rapides et précoces au niveau du système musculaire et mettent en valeur la nécessité d'étudier finement ces changements initiaux et bio-marqueurs du déconditionnement musculaire ainsi que la nécessité d'optimiser les effets des contremesures sur cette période initiale.

Mots-Clés : *muscle squelettique, plasticité, hypoactivité, impesanteur, déconditionnement, amyotrophie, prévention*