HAL open science

Atrophie et récupération musculaire chez le rat âgé Immobilisé : Rôle de la nutrition

Hugues Magne

▶ **To cite this version:**

Hugues Magne. Atrophie et récupération musculaire chez le rat âgé Immobilisé : Rôle de la nutrition. Alimentation et Nutrition. Université Blaise Pascal (Clermont Ferrand 2), 2011. Français. NNT : . tel-02811469

HAL Id: tel-02811469

https://hal.inrae.fr/tel-02811469v1

Submitted on 6 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.

Distributed under a Creative Commons Attribution - NonCommercial - NoDerivatives 4.0 International License

tel-00719700, version 1 - 20 Jul 2012

UNIVERSITE BLAISE PASCAL **UNIVERSITE D'AUVERGNE**

Année 2011 **N° d'ordre : 17-DOC**

ECOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE, AGRONOMIE, ENVIRONNEMENT

N°d'ordre : 17-DOC

Thèse

Présentée à l'Université d'Auvergne
Pour l'obtention du grade de Docteur d'Université

Spécialité Nutrition

Soutenue le 4 Novembre 2011

MAGNE Hugues

Atrophie et Récupération Musculaire chez le Rat âgé Immobilisé : *Rôle de la Nutrition*

Thèse dirigée par Dominique DARDEVET

Président : Pr. Yves **BOIRIE**, PU-PH, Université d'Auvergne

Rapporteurs : Pr. Damien **FREYSSENET,** PU, Université Jean Monnet
Pr. Claire **GAUDICHON,** PU**,** AgroParisTech

Membres : Dr. Corinne **MARMONIER,** Chef de Service Recherche Nutrition-Santé, CNIEL
Dr. Dominique **DARDEVET**, Directeur de Recherches, INRA

Unité de Nutrition Humaine, UMR 1019
INRA, Centre de Clermont-Ferrand/Theix
63122 Saint Genès Champanelle

tel-00719700, version 1 - 20 Jul 2012

Résumé

La perte de masse et de force musculaires liée à l'âge, ou sarcopénie, pourrait être partiellement expliquée par un défaut de récupération de masse musculaire après des épisodes générateurs d'atrophie musculaire. Ainsi, les périodes d'immobilisation qui augmentent avec l'âge (alitement, convalescence, fracture) pourraient être suivies d'une absence de récupération musculaire et contribuer à la fonte musculaire au cours du vieillissement. Les causes de ce défaut de récupération impliquent notamment un déséquilibre du taux de renouvellement protéique et du taux de renouvellement cellulaire. L'objectif de cette thèse a donc été de mettre en évidence les mécanismes responsables de l'atrophie musculaire chez le rat âgé au cours de l'immobilisation et ceux qui seraient défaillants afin de déceler les mécanismes à cibler pour favoriser la récupération musculaire.

Des rats âgés ont été immobilisés pendant 8 jours par plâtrage unilatéral de la patte arrière, puis laissés en récupération pendant 40 jours après le déplâtrage. Nous avons montré que chez ces animaux nourris avec un régime contenant 13% de caséine, l'immobilisation entraîne une atrophie des muscles immobilisés mais, contrairement au rat adulte, le rat âgé ne récupère jamais la masse musculaire perdue. L'atrophie des muscles immobilisés peut être expliquée par 1/ une augmentation de l'apoptose et de la protéolyse ubiquitine-protéasome-dépendante musculaires, 2/ une diminution de la régénération des cellules musculaires et 3/ une diminution de la protéosynthèse musculaire à l'état nourri. Tous ces phénomènes pourraient résulter de la présence d'un fort stress oxydant et d'une importante inflammation intramusculaire. Tous ces paramètres sont normalisés dès 10 jours de récupération, ce qui permet de stopper l'atrophie mais ne permet pas d'initier la phase de récupération musculaire. Nous avons donc testé l'effet de différentes supplémentations nutritionnelles au cours de la période de récupération afin de favoriser un gain de masse musculaire post immobilisation. Des supplémentations en leucine (acide aminé bien connu pour stimuler la protéosynthèse et inhiber la protéolyse) ont ainsi été réalisées. Chez les rats supplémentés, une amélioration de la synthèse protéique et une normalisation plus précoce des activités protéolytiques du protéasome ont été observées. Cependant cette amélioration du métabolisme protéique ne s'est pas traduite par un gain de masse musculaire. Par contre, la modulation qualitative et quantitative des apports en protéines a pu permettre d'obtenir une récupération significative de masse musculaire : ainsi des régimes contenant 13% de lactosérum et des régimes hyper-protéinés ont permis de gagner 50% de la masse perdue et ce, dès 20 jours de récupération.

Nos résultats montrent que l'immobilisation chez le rat âgé aggrave la sarcopénie. Une forte altération du métabolisme protéique permet d'expliquer la perte de muscle et la seule normalisation de la protéolyse et de la protéosynthèse permet d'expliquer l'absence de récupération musculaire. Nous avons montré que la modulation des apports en protéines au cours de la phase de récupération pouvait permettre un gain de protéines.

Mots-clés : sarcopénie, immobilisation, récupération, synthèse protéique, protéolyse, apoptose, régénération, leucine, protéines

tel-00719700, version 1 - 20 Jul 2012

SUMMARY

Sarcopenia, the age-related muscle mass loss, might be partially explained by an impaired muscle mass recovery of skeletal muscle mass after a catabolic state. Thus, immobilization periods which increase with aging could induce a muscle atrophy followed by a lack of muscle mass recovery. An imbalance of protein and cellular metabolisms are certainly involved in this absence of recovery. The aim on this Ph.D thesis was to explore the mechanisms involved in muscle mass atrophy during immobilization and their possible alteration during the recovery period in old rats.

Old rats were immobilized for 8 days by unilateral hind limb casting and then allowed to recover for 40 days. Our results showed that animals fed a 13% casein diet wasted muscle mass in immobilized muscles but, contrarily to adult animals, they never recovered the muscle mass loss. Muscle atrophy was due to 1/ an increase of apoptotic and ubiquitine-proteasome-dependent proteolytic pathways, 2/ a decrease of muscle regeneration processes and 3/ a decrease of muscle protein synthesis at the fed state. These changes paralleled an increase of intracellular inflammation and oxidative stress. As these parameters were only normalized during the recovery period, the resultant nitrogen balance was then not enough positive as required for the muscle protein gain, hence contributing to the age-related incomplete muscle mass recovery. We tested free leucine supplementation (an amino acid known for its stimulatory effect on protein metabolism) during the recovery period to improve muscle mass gain. This supplementation induced a greater muscle protein synthesis in supplemented animals, but without any muscle mass gain. However, we demonstrated here for the first time that muscle protein accretion after immobilization-induced atrophy could be achieved with whey protein or high protein diets.

In conclusion, we demonstrated that immobilization in old rats induced a muscle mass atrophy followed by an incomplete recovery, hence contributing to the development of sarcopenia. We also demonstrated that this lack of recovery cannot be overcome by a dietary free leucine supplementation, despite a positive effect on protein metabolism, contrarily to high protein and whey protein diets.

Key words: sarcopenia, immobilization, recovery, protein synthesis, proteolysis, apoptosis, regeneration, leucine, proteins

tel-00719700, version 1 - 20 Jul 2012

Publications

1. Magne H, Savary-Auzeloux I, Peyron MA, Migné C, Combaret L, Rémond D, Dardevet D. (2011). The lack of recovery of muscle mass during aging cannot be overcome by a dietary free leucine supplementation after prolonged immobilization. *A soumettre*, *Journal of Physiology-London*.

2. Magne H, Savary-Auzeloux I, Vazeille E, Claustre A, Attaix D, Listrat A, Santé-Lhoutellier V, Gatellier P, Dardevet D, Combaret L. (2011). Lack of muscle recovery after immobilization in old rats does not result from a defect in normalization of the ubiquitin-proteasome and the caspase-dependent apoptotic pathways. *Journal of Physiology-London* 589, 511-524.

3. Vazeille E, Slimani L, Claustre A, **Magne H**, Labas L, Béchet D, Taillandier D, Dardevet D, Attaix D, Combaret L. (2011). Curcumin treatment prevents increased proteasome and apoptosome activities in rat skeletal muscle during reloading and improves subsequent recovery. *Journal of Nutritional Biochemistry*, [Epub ahead of print].

4. Rieu I, **Magne H**, Savary-Auzeloux I, Averous J, Bos C, Peyron MA, Combaret L, Dardevet D. (2009). Reduction of low grade inflammation restores blunting of postprandial muscle anabolism and limits sarcopenia in old rats. *Journal of Physiology-London* 587, 5483-5492.

tel-00719700, version 1 - 20 Jul 2012

Communications orales

1. Magne H, Savary-Auzeloux I, Sornet C, Migné C, Combaret L, Dardevet D (2011). By contrast to whey or high protein diets, the lack of recovery of muscle mass during aging cannot be overcome by a dietary free leucine supplementation after prolonged immobilization. International Conference on Sarcopenia Research, Toulouse, France.

2. Magne H, Savary-Auzeloux I, Sornet C, Migné C, Combaret L, Dardevet D (2011). Une supplémentation en leucine améliore le métabolisme protéique musculaire mais n'améliore que faiblement la récupération de masse musculaire à la suite d'une immobilisation par plâtrage chez le rat âgé. Journée de *l'École Doctorale des Sciences de la Vie, Santé, Agronomie, Environnement*, Clermont-Ferrand, France.

3. Magne H, Savary-Auzeloux I, Vazeille E, Attaix D, Combaret L, Dardevet D (2010). Une supplémentation en leucine suite à une atrophie induite par une immobilisation par plâtrage chez le rat âgé améliore le métabolisme protéique musculaire mais n'améliore que faiblement la récupération de masse musculaire. 8èmes Journées Francophones de Nutrition, Lille, France.

4. Magne H, Savary-Auzeloux I, Vazeille E, Attaix D, Combaret L, Dardevet D (2010). Une supplémentation en leucine améliore le métabolisme protéique musculaire mais n'améliore que faiblement la récupération de masse musculaire à la suite d'une immobilisation par plâtrage chez le rat âgé. Journée Scientifique du CRNH-Auvergne, Clermont-Ferrand, France.

5. Magne H, Savary-Auzeloux I, Vazeille E, Attaix D, Combaret L, Dardevet D (2010). Une supplémentation en leucine améliore le métabolisme protéique musculaire mais n'améliore que faiblement la récupération de masse musculaire à la suite d'une immobilisation par plâtrage chez le rat âgé. Journée de la Recherche, IFR 79 Auvergne, Clermont-Ferrand, France.

tel-00719700, version 1 - 20 Jul 2012

Communications affichées

1. Magne H, Savary-Auzeloux I, Sornet C, Migné C, Combaret L, Dardevet D. (2011). A leucine supplementation after an immobilization-induced atrophy in old rats enhanced protein anabolism but failed in muscle mass recovery8th Symposium on Amino Acid and Protein Metabolism, Santa Margherita Ligure, Italy.

2. Magne H, Savary-Auzeloux I, Vazeille E, Attaix D, Combaret L & Dardevet D (2010). Blunted recovery after an immobilization-induced atrophy in old rats: mechanisms involved and effect of a leucine supplementation. NUGO Week, Glasgow.

3. Magne H, Savary-Auzeloux I, Vazeille E, Attaix D, Combaret L & Dardevet D (2010). Blunted recovery after an immobilization-induced atrophy in old rats: mechanisms involved and effect of a leucine supplementation. First International Congress of Translational Research in Human Nutrition, Clermont- Ferrand, France.

4. Magne H, Savary-Auzeloux I, Vazeille E, Dardevet D & Combaret L (2009). Impaired muscle recovery after immobilization-induced atrophy in old rats is not due to a lack of normalization of the ubiquitin-proteasome-dependant proteolysis or the mitochondria-associated apoptotic pathway. 5th Cachexia conferences, Barcelona, Spain**.**

5 Magne H, Savary-Auzeloux I, Vazeille E, Dardevet D, Combaret L (2009). L'absence de récupération musculaire suite à une atrophie induite par une immobilisation par plâtrage chez le rat âgé n'est pas dû à un défaut de régulation de la protéolyse ubiquitine-protéasome-dépendante ou de l'apoptose mitochondriale. Journée Scientifique du CRNH Auvergne, Clermont-Ferrand, France.

tel-00719700, version 1 - 20 Jul 2012

Remerciements

Je tiens à exprimer mes plus sincères remerciements aux membres du jury, qui ont accepté de juger ce travail :

Monsieur Yves Boirie, Professeur à l'Université d'Auvergne, pour m'avoir fait l'honneur d'accepter la présidence de ce jury de thèse. Qu'il veuille bien trouver ici le témoignage de mon profond respect. Je le remercie également pour les enseignements dispensés au cours de ma formation universitaire.

Monsieur Damien Freyssenet, Professeur à l'Université Jean Monnet et *Madame Claire Gaudichon*, Professeur à AgroParisTech, pour avoir accepté de juger ce travail et pour l'honneur qu'ils me font de siéger à ce jury.

Madame Corinne Marmonier, Chef de Service Recherche Nutrition-Santé au CNIEL, pour avoir accepté de siéger à ce jury. Je vous remercie chaleureusement d'avoir accepté de participer à ce jury.

Monsieur Dominique Dardevet, Directeur de Recherches INRA et directeur de cette thèse. Je te remercie sincèrement d'avoir assuré mon encadrement depuis le Master 2 et de m'avoir permis de « grandir » dans le monde la recherche. La rigueur de ton raisonnement scientifique, ton efficacité et tes compétences scientifiques ont permis à ce travail d'aboutir. Merci pour ton enthousiasme et ta présence constante.

Je souhaite également remercier :

Madame Lydie Combaret, pour avoir assuré mon encadrement au cours du Master 2 et pour sa participation à cette thèse.

Monsieur Didier Attaix. Je n'oublierai pas ce jour de 2007 où tu m'as permis d'intégrer le Master 2 malgré les circonstances et où tu m'as mis en relation avec Dominique et Lydie ; pour cela je te suis sincèrement reconnaissant.

J'exprime mes plus sincères remerciements à l'ensemble des équipes *Nutrition et Signaux Protéiques* et *Protéolyse*, et tout particulièrement à :

Claire Sornet pour son investissement au cours de ce travail de thèse. Je ne sais pas si nous arriverons un jour à percer les mystères des western-blots, mais je te remercie

tel-00719700, version 1 - 20 Jul 2012

pour tout le travail que tu as accompli et pour avoir été là depuis 3 ans. Ton pragmatisme et ton côté terre-à-terre m'ont réellement permis d'avancer au cours de ce travail.

Noureddine Hafnaoui, pour le dosage des acides aminés, et *Françoise Glomot* pour l'aide diverse qu'elle a pu m'apporter.

Isabelle Savary-Auzeloux pour son aide sur les différentes expérimentations animales et sa personnalité tellement attachante. Nos joutes verbales me manqueront !

Agnès Claustre, qui a fortement contribué à ma formation au cours du Master 2 et à l'avancé des travaux au cours de cette période. Merci pour tous tes conseils, ta présence et ta gentillesse.

Je remercie également toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à ce travail, notamment :

Anne Listrat et *Brigitte Picard*, de l'Unité de Recherche sur les Herbivores, pour leur participation à ces travaux, ainsi que *Christiane Barboiron* et *David Chadeyron* qui m'ont initié aux mystérieuses électrophorèses de myosine.

Véronique Santé-Lhoutellier, *Philippe Gatelier* et *Claude Fereira*, de l'unité Qualité des Produits Animaux, qui ont tout fait pour que les dosages urgents soient réalisés au sein de leur équipe dans les plus brefs délais.

Estelle Pujos et *Carole Migné* de l'équipe Spectrométrie de masse, pour les mesures d'enrichissement.

Christophe Del'homme, *Arlette Cissoire*, *Benoît Cohade, Philippe Lhoste et Christian Lafarge* pour leur aide sur les différentes expérimentations animales et le soin apporté aux animaux.

Kelly Skorzybot, *Caroline Habauzit* pour tout le travail acompli au cours de leurs stages dans le cadre de ce travail, ainsi que *Julien Amat* pour son aide au cours des derniers mois.

L'ensemble des secrétaires pour leur aide variée mais indispensable au cours de ces 3 années.

Hélène Lafarge pour son aide précieuse dans le recueil des données bibliographiques, ainsi que *Gérard Donadille* pour ses nombreux dépannages informatiques.

Je remercie l'ensemble des personnes ayant participé aux différents comités de thèse : *Cécile Bos*, *Claire Gaudichon*, *Brigitte Picard*, *Isabelle Savary-Auzeloux*, *Lydie Combaret*,

tel-00719700, version 1 - 20 Jul 2012

et *Dominique Dardevet*. Nos discussions ont permis de faire évoluer ce travail avec justesse et je vous en remercie.

Je souhaite tout particulièrement remercier l'équipe universitaire qui m'a donné l'envie de travailler en Nutrition Humaine, et que j'ai pu côtoyer depuis 8 ans et pendant mes 3 ans d'enseignement, tout particulièrement :

Monique Alric. Tu m'as dit un jour que j'étais sans doute l'étudiant qui t'avait le plus embêtée depuis que la formation existe, et c'est pour moi une grande satisfaction ! Je souhaite te remercier encore pour ton aide lorsque j'ai souhaité intégrer le Master 2 « en catastrophe » et pour m'avoir mis en relation avec Didier.

Marie-Chantal Farge, pour ta présence constante au cours de mes études, ta gentillesse et ton soutien indéfectible. Tu es une personne rare et je souhaite que tous ceux qui auront la chance de te côtoyer prennent le temps d'apprécier tes qualités humaines et professionnelles.

Christelle Guillet et *Corinne Aubel*, pour leur gentillesse et leur présence notamment au cours de cette dernière année. J'ai pu apprécier l'encadrement que nous avons réalisé ensemble et la *Journée des Anciens* qui en a résulté restera longtemps dans ma mémoire.

Monsieur Jean-François Jarrige, mon tuteur universitaire. Merci de m'avoir permis de réaliser mon monitorat à vos côtés, et merci de m'avoir laissé faire tout ce que j'avais envie ! Je vous remercie pour tout ce que vous m'avez appris depuis la Licence et au cours de ce monitorat. Soyez assuré de mon profond respect et surtout, ne changez jamais…

Il m'est impossible de ne pas remercier ici *mon toulonnais préféré*, qui se reconnaîtra. Notre amitié a grandi tout au long de cette thèse et à ta façon, tu as toujours été là pour moi. Merci de ta présence et de ton amitié, bon courage à toi pour l'avenir !

Rien n'aurait été pareil sans mes amis de plus ou moins longue date : *Céline*, *Sabrina*, *JB*, *Benjamin* et bien sûr *Marie-Laure*. Merci pour votre bonne humeur, votre solidarité et votre aide précieuse.

Merci bien évidemment à *Carole* et *Julien* pour ces 6 derniers merveilleux mois passés au labo dans la bonne humeur. Je vous souhaite bon courage pour la suite !

Je souhaite aussi remercier toutes les personnes qui ont relu et corrigé ce manuscrit : Dominique, Michèle, Isabelle, Lydie et Carole.

Bien évidemment je ne peux terminer sans remercier ma famille et tout particulièrement mes parents pour le soutien qu'ils ont pu m'apporter au long de ces nombreuses années. Merci de vos encouragements indéfectibles et de m'avoir toujours laissé libre de mes choix.

Enfin je remercie toutes les personnes qui m'ont soutenu et que j'aurai bien involontairement oubliées.

tel-00719700, version 1 - 20 Jul 2012

tel-00719700, version 1 - 20 Jul 2012

Sommaire

INTRODUCTION GENERALE 1

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE 5

Chapitre 1 : Vieillissement musculaire : sarcopénie 6

1. La sarcopénie 6
1.1. Définition 6
1.2. Diminution de la masse et de la force musculaires 6
- *Diminution de la masse musculaire* 6
- *Diminution de la force musculaire* 7

1.3. Conséquences de la sarcopénie 8

2. Rappels sur les typologies musculaires – Modulation avec la sarcopénie 8
2.1. Généralités sur les fibres musculaires squelettiques 8
2.2. Modifications de la typologie musculaire 9
2.3. Modifications au cours de la sarcopénie 9

3. Causes de la sarcopénie : mécanismes potentiels et modèles de fonte musculaire 10
3.1. Les mécanismes généraux de la sarcopénie 10
3.2. Cinétique d'apparition de la sarcopénie : deux mécanismes possibles 12
3.3. Impact de l'inactivité physique sur la fonte musculaire 13

Chapitre 2 : Mécanismes contrôlant la taille du compartiment musculaire : mécanismes physiologiques et modifications au cours du vieillissement et de l'inactivité physique 15

1. Le métabolisme protéique musculaire 15
1.1. La dégradation protéique 16
1.1.1. La voie lysosomale et la voie calcium-dépendante 16
1.1.1.1. La voie lysosomale 16
1.1.1.2. La voie calcium-dépendante 18
1.1.2. La voie ubiquitine-protéasome-dépendante 18
- *Polyubiquitination des protéines à dégrader* 19
- *Dégradation des protéines polyubiquitinées par le protésome 26S* 20

1.1.3. Coopération des différents systémes protéolytiques 21
1.2. La synthèse protéique 22
1.3. Généralités 22
1.4. Voies de signalisation de la synthèse des protéines 23

2. Contrôle de la masse cellulaire 24
2.1. L'apoptose ou mort cellulaire programmée 24
- *La voie des récepteurs de mort* (ou voie extrinsèque) 26
- *La voie mitochondriale* (ou voie intrinsèque) 26

2.2. La différenciation/régénération cellulaire 28

3. Le métabolisme protéique musculaire au cours de deux situations d'atrophie : le vieillissement et l'inactivité physique 29
3.1. La dégradation protéique 29
- *Au cours du vieillissement* 29
- *Au cours de l'inactivité physique chez l'adulte* 31
- *Au cours du vieillissement et de l'inactivité physique* 33

3.2. La synthèse protéique 33
- *Au cours du vieillissement* *33*
- *Au cours de l'inactivité physique chez l'adulte* *34*
- *Au cours du vieillissement et de l'inactivité physique* *35*

4. Le métabolisme cellulaire au cours du vieillissement et de l'inactivité physique 36
4.1. L'apoptose ou mort cellulaire programmée 36
- *Au cours du vieillissement* *36*
- *Au cours de l'inactivité physique chez l'adulte* *37*
- *Au cours du vieillissement et de l'inactivité physique* *39*

4.2. La différenciation/régénération cellulaire 39
- *Au cours du vieillissement* *39*
- *Au cours de l'inactivité physique chez l'adulte* *40*
- *Au cours du vieillissement et de l'inactivité physique* *40*

5. Rôle du stress oxydant et de l'inflammation dans les atrophies musculaires liées au vieillissement ou à l'inactivité physique 41
- *Au cours du vieillissement* *42*
- *Au cours de l'inactivité physique chez l'adulte* *43*
- *Au cours du vieillissement et de l'inactivité physique* *45*

6. Récupération musculaire suite à l'immobilisation 46
6.1. Mécanismes généraux chez l'adulte 46
- *Gain de fibres musculaires* *46*
- *Gain de protéines musculaires* *47*
- *Rôle des processus inflammatoires* *48*

6.2. Au cours du vieillissement 49

Chapitre 3 : Nutrition protéique et récupération musculaire **51**

1. Régulations nutritionnelles du métabolisme protéique musculaire 51
1.1. Effet des acides aminés sur la protéosynthèse et la protéolyse musculaires : effet de l'âge 51
1.2. Effet d'acides aminés spécifiques 52
1.3. Effet de la leucine 53
1.4. Vitesse de digestion des protéines : concept des protéines lentes et des protéines rapides 55

2. Modulations nutritionnelles du métabolisme protéique musculaire au cours de l'inactivité physique et de la récupération musculaire 56
2.1. Au cours de l'inactivité physique 56
- *Chez des sujets adultes* *56*
- *Chez des sujets âgés* *58*

2.2. Au cours de la récupération musculaire 59
- *Chez des sujets adultes* *59*
- *Chez des sujets âgés* *59*

OBJECTIFS DE L'ETUDE & STRATEGIE EXPERIMENTALE **61**

PRESENTATION DES TRAVAUX **64**
Publication 1 *65*
Publication 2 *83*

DISCUSSION GENERALE& PERSPECTIVES 120

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES **131**

tel-00719700, version 1 - 20 Jul 2012

Liste des Abréviations

ADN : Acide Désoxyribonucléique

ARNm : Acide Ribonucléique messager

ARNt : Acide Ribonucléique de transfert

Atg : Autophagy related

ATP : Adénosine Triphosphate

CMH : Chaînes lourdes de myosine

E1 : Ubiquitin-activating enzyme ou enzyme d'activation

E2 : Ubiquitin-conjugating enzyme ou enzyme de conjugaison

E3 : Enzyme ligase

FoxO : Forkhead Box O

GTP : Guanosine Triphosphate

IAP : Inhibitor of Apoptosis Protein

LC3 : Microtubule-associated protein light chain 3

MAFbx : Muscle Atrophy Fbox

MRF : Muscle Regulatory Factors

mTOR : mammalian Target of Rapamycin

MuRF1 : Muscle Ring Finger 1

Myf-5 : Myogenic factor 5

MyoD : Myogenic Differenciation 1

NF-κB : Nuclear Factor-kappa B

PI3K : Phosphatidyl-inositol 3-kinase

ROS : Espèces Réactives de l'Oxygène

S6K1 : Ribosomal Protein S6 Kinase of 70 kDa

Smac/DIABLO : Second Mitochondria-derived Activator of Caspases/Direct IAP-Binding Protein with Low pI

TBARS : Thiobarbituric Acid Reactive Substances

TNF-α : Tumor Necrosis Factor alpha

TSC1-TSC2 : Tuberous Sclerosis Complex 1-2

XIAP : X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein

tel-00719700, version 1 - 20 Jul 2012

Liste des Figures

Figure 1 : Nombre moyen de personnes âgées de respectivement 60, 75 et 85 ans ou plus.

Figure 2 : Evolution de la composition corporelle au cours du vieillissement.

Figure 3 : Coupe de la cuisse obtenue par imagerie par résonnance magnétique chez un homme âgé de 25 ans ou de 63 ans.

Figure 4 : Diminution de la masse musculaire totale et de la masse musculaire des membres inférieurs et supérieurs en fonction de l'âge et du sexe.

Figure 5 : Diminution de la force maximale relative du muscle de la cuisse chez l'homme et la femme en fonction de l'âge.

Figure 6 : Conséquences de la sarcopénie.

Figure 7 : Evolution de la composition en type de fibres et de la surface des fibres musculaires au cours du vieillissement.

Figure 8 : Mécanismes favorisant ou limitant la sarcopénie.

Figure 9 : Le « Catabolic crisis model » de la sarcopénie : un modèle de fonte musculaire accélérée.

Figure 10 : Conséquences de l'inactivité physique/immobilisation.

Figure 11 : Schéma général du métabolisme protéique pour un individu de 75 kg.

Figure 12 : Modulation de la balance azotée et du métabolisme protéique au cours de la journée.

Figure 13 : Dégradation lysosomale : voies de l'autophagie.

Figure 14 : Dégradation lysosomale : voie de l'hétérophagie.

Figure 15 : Le système protéolytique ubiquitine-protéasome-dépendant.

Figure 16 : Le protéasome 26S présenté en 2 dimensions par microscopie et par modélisation.

Figure 17 : Rôle central des facteurs de transcription FoxO dans les phénomènes protéolytiques.

Figure 18 : Représentation shématique de la synthèse des protéines dans la cellule.

Figure 19 : Etape d'initiation de la traduction des protéines.

Figure 20 : Schéma simplifié de la voie d'activation de mTORC1.

Figure 21 : Apoptose cellulaire : représentation schématique et visualisation d'une cellule en apoptose par immunofluorescence.

Figure 22 : Voie extrinsèque des récepteurs de mort de l'apoptose.

Figure 23 : Voies intrinsèques apoptotiques mitochondriales.

Figure 24 : Mécanismes de la régénération/différenciation musculaire.

Figure 25 : Défaut de réponse de la voie ubiquitine-protéasome-dépendante au cours du vieillissement en réponse à des stimuli cataboliques et anaboliques : effet d'un traitement aux glucocorticoïdes et effet de la prise alimentaire.

tel-00719700, version 1 - 20 Jul 2012

Figure 26 : Effet de l'inactivité physique sur différentes composantes des voies protéolytiques obtenu par un modèle de suspension et par un modèle de plâtrage chez le rat.

Figure 27 : Altération de la réponse de la synthèse protéique chez l'homme en réponse à des signaux anaboliques.

Figure 28 : Altération de la synthèse protéique à l'état postprandial par l'immobilisation chez l'homme adulte.

Figure 29 : Apoptose dans les muscles *plantaris* mesurée chez des rats adultes et des rats âgés.

Figure 30 : Apoptose mesurée dans les muscles *soleus* chez des rats adultes et des rats âgés immobilisés par suspension.

Figure 31 : Rôle du stress oxydant et des radicaux libres dans l'atrophie musculaire.

Figure 32 : Rôle des protéines IκB dans la voie de signalisation du facteur de transcription NF-κB.

Figure 33 : Effet stimulateur comparé des acides aminés sur la synthèse protéique musculaire chez le rat adulte et le rat âgé.

Figure 34 : Effet des acides aminés essentiels sur la synthèse protéique musculaire chez l'homme âgé.

Figure 35 : Les acides aminés à chaînes ramifiées.

Figure 36 : Impact d'une supplémentation en leucine sur la synthèse protéique chez l'homme âgé.

Figure 37 : Effet d'une perfusion d'acides aminés sur la synthèse protéique musculaire de l'homme adulte.

Figure 38 : Vitesse de digestion des protéines chez l'homme : concept des protéines lentes et des protéines rapides.

Figure 39 : Modèle d'immobilisation par plâtrage.

Figure 40 : Schéma récapitulatif des différentes expérimentations.

Figure 41 : Concept de « résistance anabolique » au cours de l'immobilisation.

Figure 42 : Stratégies nutritionnelles permettant de diminuer le seuil d'anabolisme musculaire augmenté par l'immobilisation ou de dépasser ce seuil.

tel-00719700, version 1 - 20 Jul 2012

Liste des tableaux

Tableau 1 : Espérance de vie à la naissance en 2005 et en 2050 (en années) en France métropolitaine.

Tableau 2 : Diminution de la force musculaire avec l'âge.

Tableau 3 : Typologie et caractéristiques des fibres musculaires squelettiques.

Tableau 4 : Composition en fibres (en %) de différents muscles de la patte postérieure du rat.

tel-00719700, version 1 - 20 Jul 2012

tel-00719700, version 1 - 20 Jul 2012

INTRODUCTION GENERALE

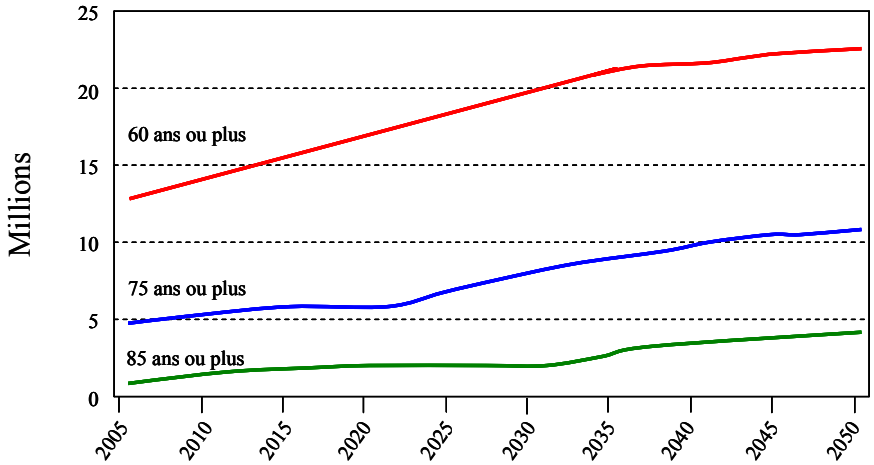


Figure 1 : Nombre moyen de personnes âgées de respectivement 60, 75 et 85 ans ou plus. Champ : France métropolitaine.

Source : Projections de population 2005-2050, INSEE.

Tableau 1 : Espérance de vie à la naissance en 2005 et en 2050 (en années) en France métropolitaine.

Hypothèse de mortalité	2005			2050		
	Femmes	Hommes	*Différence*	Femmes	Hommes	*Différence*
Centrale (tendancielle)	83,8	76,9	*7,1*	89	83,8	*5,2*
« Espérance de vie basse »				86,5	81,3	*5,2*
« Espérance de vie haute »				91,5	86,3	*5,2*

Source : Projections de population 2005-2050, INSEE

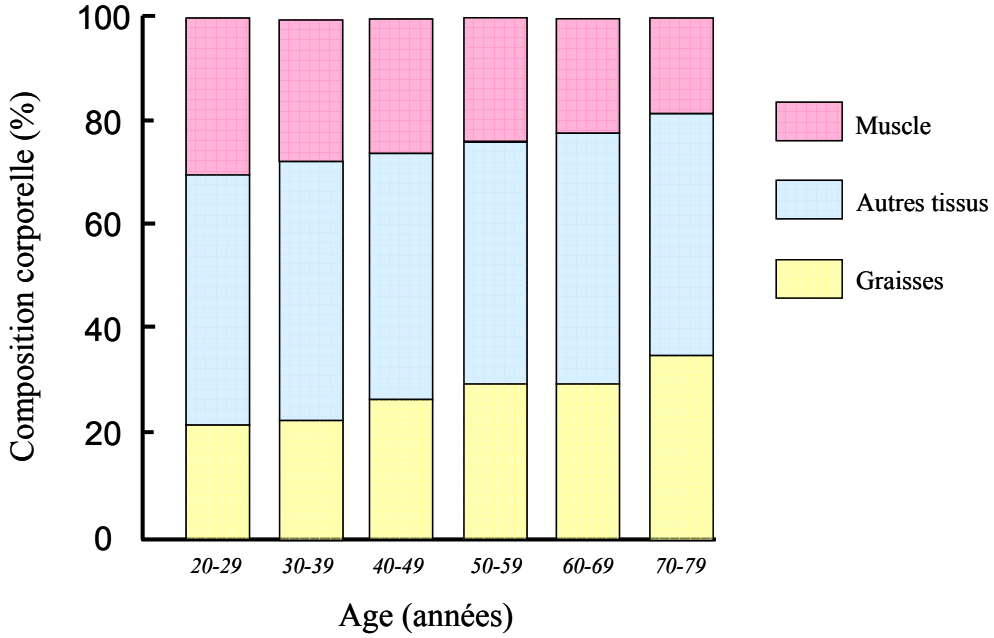


Figure 2 : Evolution de la composition corporelle au cours du vieillissement *(d'après Cohn et coll. 1980).*

tel-00719700, version 1 - 20 Jul 2012

La proportion des personnes âgées dans la population ne cesse d'augmenter dans les pays industrialisés. En France, selon l'INSEE, près d'un habitant sur trois aura plus de 60 ans en 2050, contre un sur cinq en 2005. Ainsi, en 2050, la France métropolitaine compterait 22,3 millions de personnes âgées de 60 ans ou plus, soit près de deux fois plus qu'en 2005 (+80%). La croissance de la population âgée est encore plus spectaculaire au sommet de la pyramide des âges : d'après les prévisions, l'effectif des 75 ans et plus passerait de 4,9 à 10,9 millions entre 2005 et 2050 et celui des 85 ans et plus de 1,1 à 4,2 millions (**Figure 1**). L'espérance de vie serait alors de 89,0 ans pour les femmes et 83,8 ans pour les hommes (**Tableau 1**). Cet accroissement continu de la longévité s'explique par l'amélioration de la qualité de vie, de l'alimentation, mais aussi par les progrès de la médecine. Par contre, une des conséquences de cet accroissement sera inéluctablement une augmentation des dépenses de santé publique (prise en charge médicamenteuse, hospitalisation).

Le vieillissement est caractérisé par un déclin de nombreuses fonctions physiologiques et par des modifications importantes de la composition corporelle : changement de la teneur en eau de l'organisme, augmentation de la proportion de la masse grasse au détriment de la masse maigre (**Figure 2**). Différentes études longitudinales montrent que la masse maigre subit une réduction importante entre 40 et 60 ans chez l'homme et seulement après 60 ans chez la femme (Flynn et coll. 1989). A partir de 60 ans, la perte atteint 1% par an (Frontera et coll. 2000 ; Hughes et coll. 2001). Cette perte de masse maigre est essentiellement liée à une diminution de la masse musculaire (Cohn et coll. 1980). Cette atrophie musculaire liée au vieillissement est appelée *sarcopénie*.

Le muscle squelettique représente 40% des protéines totales de l'organisme. En dehors de son rôle fonctionnel, le muscle possède un autre rôle majeur puisqu'il est un réservoir important d'acides aminés mobilisables par l'organisme en cas d'agressions d'ordre nutritionnel, infectieux ou traumatique (Young et coll. 1989). L'érosion du capital protéique musculaire chez la personne âgée est donc responsable à la fois d'une réduction de la mobilité mais aussi d'une moindre capacité de réponse aux agressions et ainsi d'une augmentation des pathologies et des périodes de convalescence, ceci entraînant une perte d'autonomie progressive.

Cependant, la sarcopénie est un phénomène complexe dont les mécanismes restent encore mal compris. La taille du compartiment musculaire dépend de la quantité de protéines totales du muscle et résulte donc d'un équilibre entre les vitesses et quantités de protéines synthétisées et les vitesses et quantités de protéines dégradées.

tel-00719700, version 1 - 20 Jul 2012

Chez la personne âgée, ce déséquilibre peut en partie s'expliquer par une moindre réponse aux stimuli anaboliques et/ou par une exacerbation des effets délétères associés aux états cataboliques (Mosoni et coll. 1995 ; Dardevet et coll. 1995 ; Mosoni et coll. 1999 ; Dardevet et coll. 2003 ; Combaret et coll. 2005). De plus, la non récupération de masse musculaire régulièrement perdue aux cours d'états cataboliques associés au vieillissement semble également être impliquée et participer à l'établissement de la sarcopénie (English & Paddon-Jones, 2010). La masse musculaire dépend également de l'équilibre entre les processus d'apopotose et de régénération cellulaire. Certaines données suggèrent d'ailleurs qu'une augmentation de l'apoptose cellulaire pourrait jouer un rôle majeur durant le vieillissement musculaire (Strasser et coll. 2000 ; Dirks & Leewenburgh. 2002).

La perte de masse musculaire est aussi une conséquence indésirée de l'inactivité physique. Or, cette dernière est une situation inhérente au vieillissement, qu'elle résulte des conséquences de la sarcopénie sur les performances physiques ou d'une période d'alitement consécutive à une maladie.

Ainsi, limiter la fonte musculaire au cours des périodes d'immobilisation et potentialiser la phase de récupération permettraient donc non seulement de réduire les périodes de convalescence mais aussi de limiter le développement de la sarcopénie. Bien que l'exercice physique ait un effet bénéfique sur la masse musculaire, cette mesure n'est pas toujours applicable, en particulier lorsque l'inactivité résulte d'une blessure ou d'un traumatisme. Le recours à d'autres stratégies telles que des stratégies nutritionnelles s'impose donc.

Les mécanismes mis en jeu *au cours de l'immobilisation* et les altérations possibles du métabolisme musculaire sont encore mal décrits chez la personne âgée, voire inexistants lors des *phases de récupération* (Chakravarthy et coll. 2000 ; Zarzhevsky et coll. 2001a ; Suetta et coll. 2009). De manière à pouvoir établir les cibles potentielles pour une ou des stratégies nutritionnelles adaptées, il est donc nécessaire 1/ de mettre à jour les mécanismes conduisant à l'atrophie au cours d'une période d'immobilisation et 2/ de déceler les mécanismes mis en jeu, ou au contraire défaillants, au cours de la récupération musculaire.

L'étude bibliographique présentée dans la première partie de ce travail permet tout d'abord de résumer l'état des connaissances sur la sarcopénie et sa physiopathologie (***Chapitre 1***). Nous présenterons ensuite les mécanismes contrôlant la taille du compartiment musculaire en situation normale, au cours du vieillissement et de l'inactivité

tel-00719700, version 1 - 20 Jul 2012

physique (***Chapitre 2***), puis les différentes stratégies nutritionnelles pouvant être envisagées pour favoriser la récupération musculaire (***Chapitre 3***).

La seconde partie du document est consacrée à la présentation et à la discussion des résultats expérimentaux sous forme de publications. Nous nous sommes tout d'abord intéressés à l'immobilisation en tant que situation génératrice d'atrophie, avec pour hypothèse de travail qu'une telle situation au cours du vieillissement pouvait générer des pertes de masse musculaire non récupérées et ainsi participer à l'établissement et/ou l'aggravation de la sarcopénie. ***La première partie de mon travail de thèse a donc consisté à caractériser les mécanismes impliqués dans l'atrophie musculaire chez le rat âgé soumis à une période d'immobilisation puis à décrire ces mécanismes au cours de la phase de récupération musculaire.*** L'objectif de ces expériences était de déceler les mécanismes défaillants au cours de la période de récupération afin de proposer des stratégies nutritionnelles adaptées pouvant aider au gain de masse musculaire chez la personne âgée immobilisée. ***La seconde partie de mon travail de thèse a donc consisté à étudier l'impact d'une supplémentation en acides aminés ou protéines particulières sur la récupération musculaire chez le rat âgé immobilisé. Lors de cette dernière étude nous avons administré des acides aminés ou protéines susceptibles de moduler le métabolisme protéique chez le rat âgé et ainsi de potentialiser la synthèse des protéines musculaires.***

tel-00719700, version 1 - 20 Jul 2012

tel-00719700, version 1 - 20 Jul 2012

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

tel-00719700, version 1 - 20 Jul 2012

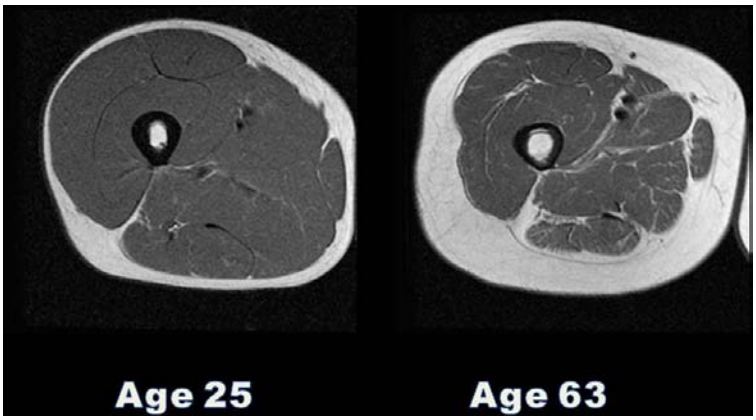


Figure 3 : Coupe de la cuisse obtenue par imagerie par résonnance magnétique chez un homme âgé de 25 ans ou de 63 ans *(d'après Wilson et coll. 2008)*. Les régions noires représentent le muscle et les régions blanches correspondent aux tissus adipeux et conjonctif.

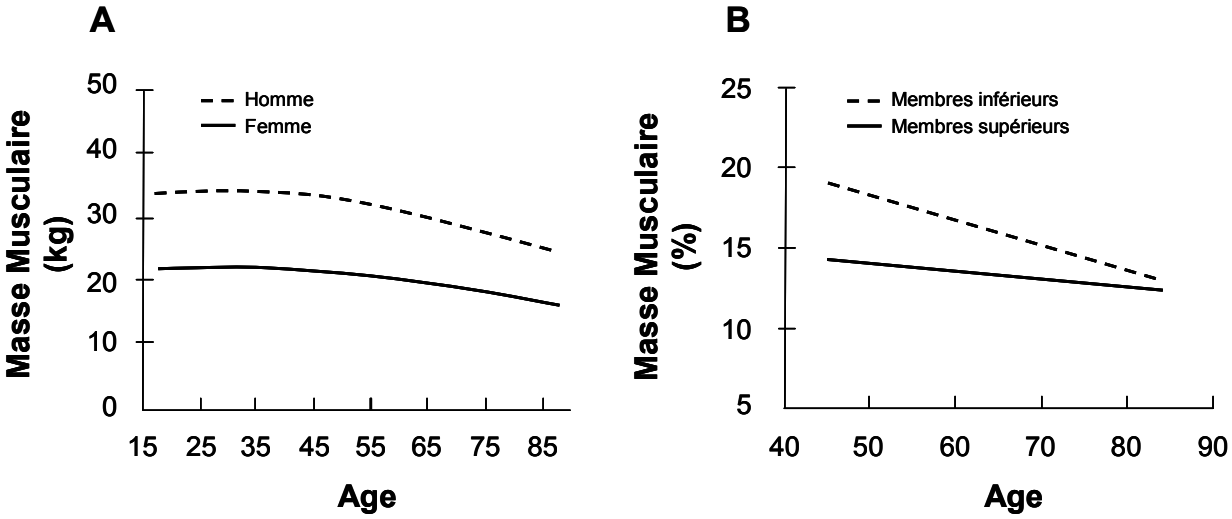


Figure 4 : Diminution de la masse musculaire totale *(A)* et de la masse musculaire des membres inférieurs et supérieurs *(B)* en fonction de l'âge et du sexe *(d'après Janssen et coll. 2000).*

Chapitre 1 : Vieillissement musculaire : sarcopénie

1. La sarcopénie

1.1. Définition

Le terme sarcopénie (du grec : *sarx* : la chair et *penia* : la perte) a été proposé en 1989 pour désigner la perte involontaire et physiologique de masse musculaire survenant au cours du vieillissement (Rosenberg 1989). Cette définition purement quantitative (perte de masse) a, depuis, bien évolué. Aujourd'hui, le groupe européen de réflexion sur la sarcopénie (European Working Group on Sarcopenia in Older People), dont l'une des missions était d'établir un consensus sur la définition de la sarcopénie, insiste sur la nécessité de prendre en compte à la fois la *perte de masse* et la *perte de fonction musculaire* : **ainsi la sarcopénie se définit maintenant comme la diminution de la masse et de la force musculaires, associées à une baisse des performances physiques** (Cruz-Jentoft et coll. 2010). Cette perte de muscle s'accompagne également d'une infiltration intramusculaire de tissu adipeux et d'un remodelage du tissu conjonctif musculaire (Jubrias et coll. 1997) (**Figure 3**).

La sarcopénie affecte toutes les personnes âgées y compris celles considérées en bonne santé (Gallagher et coll. 2000 ; Marzetti & Leeuwenburgh 2006) et les individus ayant gardé une activité sportive (Roubenoff & Hughes 2000). Différentes études estiment que 25% des personnes de plus de 70 ans et 40% des plus de 80 ans seraient sarcopéniques (Baumgartner et coll. 1998 ; Iannuzzi-Sucich et coll. 2002).

1.2. Diminution de la masse et de la force musculaires

- *Diminution de la masse musculaire*

A poids équivalent, la masse musculaire représente environ 45% du poids du corps à 20-29 ans et seulement 30% chez les sujets de 70-79 ans (Janssen et coll. 2000). La masse musculaire absolue diminue approximativement de 4% par décennie après l'âge de 20 ans (Kehayias et coll. 1997), puis de 1 à 2% par an après l'âge de 50 ans (Hughes et coll. 2001 ; Vandervoort 2002 ; Hiona & Leeuwenburgh 2008) (**Figure 4**). Entre 50 et 60 ans, la

tel-00719700, version 1 - 20 Jul 2012

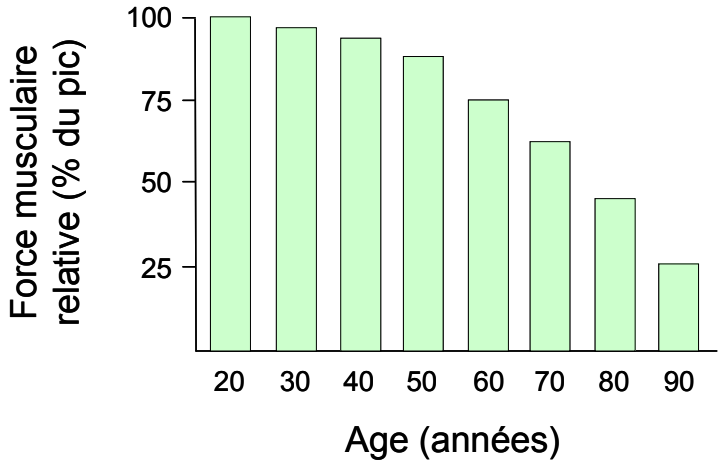


Figure 5 : Diminution de la force maximale relative du muscle de la cuisse chez l'homme et la femme en fonction de l'âge *(d'après Lindle et coll. 1997).*

Tableau 2 : Diminution de la force musculaire avec l'âge *(d'après Lang et coll. 2010).*

Etude	Sexe	Articulation/Mouvement	Age moyen (années)	Changements avec l'âge
Dean et coll. 2004	F	Hanche/FLX, EXT	21-82	- 22-33%
Johnson et coll. 2004	F	Hanche/AD, AB	21-91	- 24-56%
Kubo et coll. 2007	H	Cheville/FP	20-77	- 40%
Morse et coll. 2005	H	Cheville/FP	25-74	- 47%
Petrella et coll. 2005	H, F	Genoux/EXT	20-75	- 41-137%
Lanza et coll. 2003	H	Genoux, Cheville/EXT, DF	20-85	- 26-32%

F : femme, H : homme, FLX : flexion, EXT : extension, AD : adduction, AB : abduction, FP : flexion plantaire, DS : dorsoflexion

tel-00719700, version 1 - 20 Jul 2012

masse musculaire reste donc relativement stable puis la perte s'accélère à nouveau après l'âge de 60 ans pour atteindre 1% par an (Frontera et coll. 2000 ; Hughes et coll. 2001). Au cours d'une étude transversale réalisée chez des sujets âgés de 18 à 88 ans, Jansen et coll. ont montré que cette perte de masse est plus importante chez les hommes que chez les femmes (2000). Ainsi, la diminution de masse est de 1,9 kg par décennie pour les hommes et seulement 1,1 kg par décennie pour les femmes (Janssen et coll. 2000). Cette différence s'expliquerait par une moindre possibilité de perte chez la femme due à un capital musculaire moins important que celui des hommes (Gallagher et coll. 1997). Cette atrophie musculaire n'est pas homogène et touche plus particulièrement les membres inférieurs (Janssen et coll. 2000 ; Gallagher et coll. 2000 ; Kubo et coll. 2003) (**Figure 4**). La perte de masse musculaire traduit une perte des protéines musculaires et ceci a été bien démontré chez l'animal. Ainsi, Mosoni et coll. ont rapporté une perte de 29% de la masse protéique dans les muscles de rats âgés de 24 mois par rapport à des rats adultes de 12 mois (Mosoni et coll. 1993) et ces résultats ont été confirmés par d'autres études (Arnal et coll. 2002 ; Dardevet et coll. 2002).

➢ *Diminution de la force musculaire*

Lors d'une atrophie musculaire, il est important de prendre en compte la perte de masse mais aussi la perte de fonctionnalité musculaire. Ces deux éléments sont indissociables et étroitement liés. En effet, la force musculaire est directement dépendante de la masse musculaire, ce qui en fait un bon indice de la fonctionnalité musculaire. Ainsi, la masse musculaire étant l'un des déterminants majeurs de la performance musculaire des membres inférieurs, l'une des conséquences de la sarcopénie est la perte de force musculaire (Visser et coll. 2002 ; Frontera et coll. 2008). La force musculaire diminue en moyenne de 1,5% par an entre 50 et 60 ans, puis au rythme de 3% par an (Vandervoort et coll. 1990 ; Aniansson et coll. 1992 ; Vandervoort 2002 ; Frontera et coll. 2008) (**Figure 5** et **Tableau 2**). Des modifications de la structure des fibres musculaires, en particulier au niveau de leur typologie, permettent d'expliquer cette perte de force survenant au cours de la sarcopénie ainsi qu'une perte de fonctionnalité musculaire (*voir § 2.3*). A titre d'exemple, Jette & Branch ont montré que 40% des femmes âgées de 55-65 ans étaient incapables de soulever plus de 4,5 kg par une contraction du biceps et ce chiffre atteignait plus de 65% chez des femmes de 75-85 ans (1981).

tel-00719700, version 1 - 20 Jul 2012

tel-00719700, version 1 - 20 Jul 2012

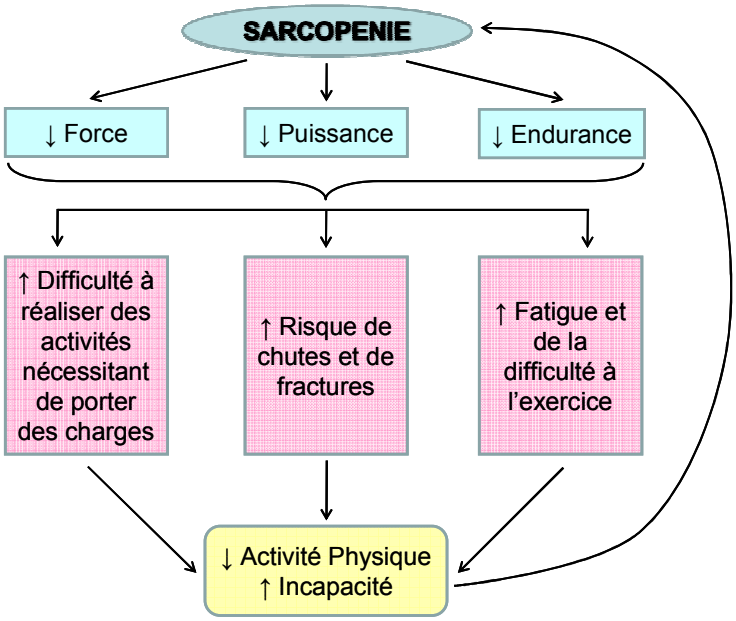


Figure 6 : Conséquences de la sarcopénie.

Tableau 3 : Typologie et caractéristiques des fibres musculaires squelettiques *(d'après Picard et coll. 2003).*

Typologie / Caractéristiques	Fibres lentes	Fibres rapides		
		Type IIA	Type IIX	Type IIB
CMH	I	IIA	IIX	IIB
Contraction	lente	rapide	rapide	rapide
Métabolisme	oxydatif	mixte	mixte	glycolytique
Mitochondries	+++	++	+	+
Fatigabilité	+++	++	+	+

CMH : Chaîne lourde de la myosine

Tableau 4 : Composition en fibres (en %) de différents muscles de la patte postérieure du rat *(d'après Taillandier et coll. 1993).*

Type de fibre / Muscle	I	IIA	IIB
Gastrocnemius	30	62	8
Soleus	87	13	
Extensor Digitirom Longus	2	42	56
Adductor Longus	82	18	
Vastus Intermedius	59	41	
Tibialis Anterior		28	72
Plantaris	9	50	41

1.3. Conséquences de la sarcopénie

Le développement de la sarcopénie est associé à une augmentation du risque de chutes et de blessures ainsi qu'à l'apparition d'une incapacité physique fonctionnelle (Janssen et coll. 2002-2004) (**Figure 6**). Chez les personnes les plus atteintes, l'incapacité physique qui en résulte peut nuire gravement à l'autonomie en empêchant ces personnes d'accomplir correctement des activités basiques de la vie quotidienne (Dehail et coll. 2001 ; Janssen et coll. 2004). À ce titre, la sarcopénie est maintenant reconnue comme étant un facteur central dans la physiopathologie du syndrome de fragilité chez la personne âgée (Morley et coll. 2006). Ce syndrome, dont la prévalence est élevée chez les sujets âgés, est hautement prédictif d'évènements négatifs tels que l'hospitalisation, la dépendance, l'institutionnalisation et corrèle avec une augmentation de la mortalité et de la morbidité (Fried et coll. 2001).

Aux États-Unis, le coût direct de la prise en charge des conséquences de la sarcopénie a été estimé à environ 18,5 milliards de dollars pour l'année 2000 (Janssen et coll. 2004). Ramenées à l'échelle de la France, ces données suggèrent que 2,5 à 3% des dépenses générales des soins de santé de la Sécurité sociale seraient directement imputables à la sarcopénie, soit une dépense annuelle d'environ 640 euros par personne.

2. Rappels sur les typologies musculaires – Modulation avec la sarcopénie

2.1. Généralités sur les fibres musculaires squelettiques

Un muscle est généralement composé de plusieurs types de fibres musculaires ayant des propriétés métaboliques et contractiles différentes. Il en existe trois types principaux : les fibres lentes oxydatives (ou fibres de type I), les fibres rapides glycolytiques (ou fibres de types IIB et IIX), et les fibres rapides oxydo-glycolytiques (ou fibres de type IIA). Cette classification découle du type prépondérant d'isoforme de chaînes lourdes de myosine (CMH) au sein du muscle. Le type de fibres dominantes donne les caractéristiques physiologiques et biochimiques essentielles du muscle (**Tableau 3** et **Tableau 4**).

- *Les fibres lentes oxydatives* (type I) sont aussi appelées fibres « rouges ». Elles possèdent peu de myofibrilles et développent donc une force très faible, mais sont très vascularisées, riches en myoglobine et contiennent de nombreuses mitochondries et peu de glycogène. Elles fonctionnent selon un métabolisme oxydatif et sont donc fortement résistantes à la

tel-00719700, version 1 - 20 Jul 2012

tel-00719700, version 1 - 20 Jul 2012

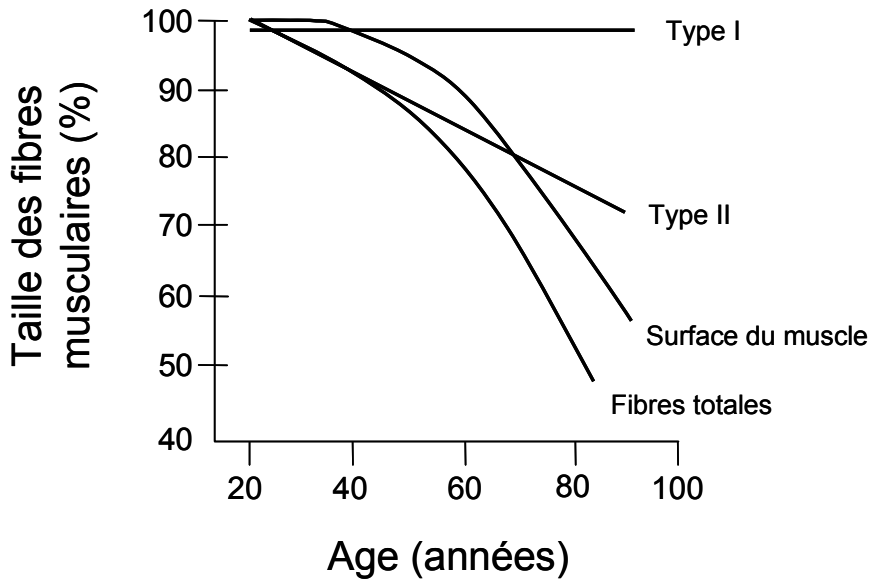


Figure 7 : Evolution de la composition en type de fibres et de la surface des fibres musculaires au cours du vieillissement *(d'après Lexell 1995).*

fatigue. Elles sont ainsi utilisées lors d'exercices peu puissants mais prolongés (maintien de la posture, endurance).

- *Les fibres rapides glycolytiques* (type IIB et IIX) ou fibres « blanches » développent une contraction extrêmement rapide, mais sont très fatigables, car pauvres en mitochondries. Elles possèdent un nombre élevé de myofibrilles, sont peu vascularisées mais cependant riches en glycogène. Ces fibres fonctionnent selon un métabolisme glycolytique. Elles permettent de développer une force importante et sont sollicitées lors d'exercices brefs mais intenses (résistance).

- *Les fibres rapides oxydo-glycolytiques* (type IIA) ont moins de myofibrilles mais plus de mitochondries que les fibres rapides glycolytiques. Elles fonctionnent selon un métabolisme oxydo-glycolytique. Ce sont aussi des fibres « blanches », à contraction rapide. Elles sont donc plus résistantes à la fatigue que les fibres rapides glycolytiques mais ne peuvent développer une force aussi importante. Elles sont également sollicitées lors d'exercices brefs mais intenses (résistance).

2.2. Modifications de la typologie musculaire

La typologie musculaire, autrement définie comme le rapport fibres lentes/fibres rapides, n'est pas figée et peut varier au cours du temps en réponse à divers stimuli. Par exemple, un entraînement physique d'endurance et d'intensité modérée entraîne une évolution des fibres de type IIA vers le type I et inversement, des exercices « en résistance » provoquent une évolution vers les fibres rapides de type II chez des adultes ou des personnes âgées (Balagopal et coll. 2001). Cette transition du type de fibres est due à une interconversion des isoformes de CMH par l'intermédiaire d'une modulation de l'expression des gènes codant pour les CMH. Celle-ci est déclenchée par différents facteurs comme les hormones thyroïdiennes, une stimulation électrique du muscle ou encore des facteurs mécaniques comme l'élongation ou la contraction du muscle (Loughna et coll. 1990).

2.3. Modifications au cours de la sarcopénie

La sarcopénie résulte à la fois d'une diminution du nombre et de la surface des fibres musculaires (Lexell 1995) (**Figure 7**). Ainsi, des études *post mortem* réalisées chez

tel-00719700, version 1 - 20 Jul 2012

tel-00719700, version 1 - 20 Jul 2012

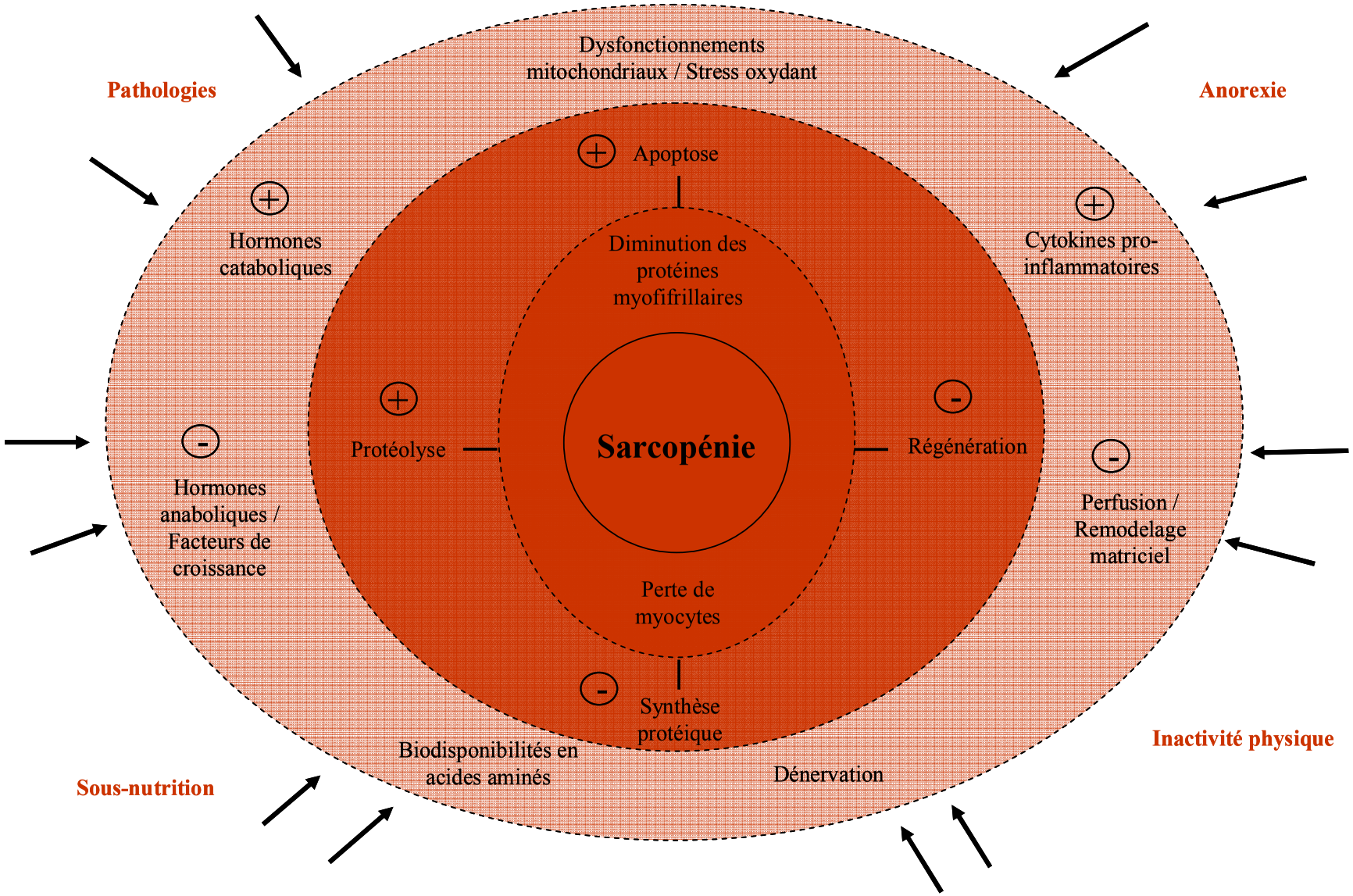


Figure 8 : Mécanismes favorisant (+) ou limitant (−) la sarcopénie *(d'après Buford et coll. 2010).*

l'homme sur les muscles *vastes externes* ont montré que le nombre et la surface des fibres musculaires étaient respectivement diminués de 39% et 29% entre 20 et 80 ans (Lexell et coll. 1983-1988 ; Lexell 1995).

Concernant les types de fibres, la sarcopénie est caractérisée par une perte majoritaire de fibres de type II (à contraction rapide) (**Figure 7**). Ces observations ont été confirmées par une étude de Balagopal et coll. qui ont enregistré une diminution des ARNm des CMH IIA et IIX avec l'âge (2001). La quantité de fibres de type I (à contraction lente) reste constante mais proportionnellement leur nombre augmente du fait de la diminution du nombre de fibres totales. Concernant la taille des fibres, ce sont préférentiellement les fibres de type IIA et IIB qui voient leur surface et leur taille diminuer au cours de l'âge (Larsson 1978 ; Lexell et coll. 1983-1988 ; Holloszy et coll. 1991 ; Brown & Hasser 1996 Kim et coll. 2005 ; Kosek et coll. 2006). Ces résultats obtenus chez le rat âgé ont été confirmés par des études chez l'homme (Proctor et coll. 1995).

Ces observations permettent d'expliquer la perte de force musculaire qui accompagne la sarcopénie. En effet, plusieurs études ont rapporté une relation positive entre la diminution du nombre de fibres totales et la réduction de force musculaire (Aniansson et coll. 1992 ; Gur et coll. 2003). De plus, comme les fibres de type II (à contraction rapide) participent 4 fois plus à la force musculaire que les fibres de type I (à contraction lente) (Faulkner et coll. 1986), ceci explique que le muscle sarcopénique ne puisse réaliser que des exercices de faible intensité.

3. Causes de la sarcopénie : mécanismes potentiels et modèles de fonte musculaire

3.1. Les mécanismes généraux de la sarcopénie

La sarcopénie est un phénomène multifactoriel (**Figure 8**). Cette atrophie musculaire liée à l'âge résulte d'une part de la perte de cellules musculaires (ou myocytes) et d'autre part de la perte de protéines myofibrillaires :

- <u>concernant la perte de myocytes</u> :

Le vieillissement est caractérisé par une augmentation de l'activation des mécanismes menant à l'apoptose des cellules musculaires (Dirks & Leeuwenburg 2004 ; Siu et coll. 2005 ; Chung & Ng 2006 ; Marzetti et coll. 2008a-2008b-2010a-2010b) ainsi qu'une

tel-00719700, version 1 - 20 Jul 2012

diminution du nombre et de la capacité de prolifération/fusion des cellules satellites (cellules indifférenciées pouvant donner, une fois différenciées, de nouvelles cellules musculaires), pouvant entraver les processus de régénération musculaire (Hawke & Garry 2001 ; Renault et coll. 2002 ; Barani et coll. 2003 ; Kadi et coll. 2004 ; Glass 2005 ; Lees et coll. 2006 ; Verdijk et coll. 2007).

- <u>concernant la perte de protéines musculaires</u> :

Une altération du taux de renouvellement protéique apparaît au cours du vieillissement (Holloszy et coll. 1991 ; Mosoni et coll. 1995 ; Combaret et coll. 2009). La régulation de la protéolyse musculaire est fortement perturbée au cours du vieillissement (Radak et coll. 2002 ; Husom et coll. 2004 ; Ferrington et coll. 2005 ; Deruisseau et coll. 2005 ; Dargelos et coll. 2007-2008 ; Combaret et coll. 2009) et le taux de synthèse des protéines musculaires (Kelly et coll. 1984 ; Fruhbeck et coll. 1996 ; Hasten et coll. 2000) et en particulier des protéines myofibrillaires (actine et myosine) (Welle et coll. 1993 ; Balagopal et coll. 1997 ; Yarasheski et coll. 1999) et mitochondriales (Rooyackers et coll. 1996) est fortement diminué. Il en résulterait un déséquilibre de la balance azotée caractéristique d'une perte protéique.

Ces deux phénomènes peuvent êtres mis en relation avec des perturbations biochimiques et métaboliques survenant au cours de l'avancée en âge :

- L'effet des *hormones anaboliques* est fortement perturbé au cours du vieillissement. Soit la concentration en hormone circulante est réduite (hormone de croissance, IGF1 (*Insulin Growth Factor-1*), testostérone, androgènes surrénaliens, DHEA (*déhydroépiandrostérone*) (Zadik et coll. 1985 ; Tenover 1997 ; Dehail & Bourdel-Marchasson 2001 ; Perrini et coll. 2010), soit la sensibilité du muscle à l'action de certaines hormones (comme l'insuline, par exemple) apparaît diminuée (Guillet et coll. 2004a ; Guillet & Boirie 2005 ; Bourdel-Marchasson et coll. 2007) au cours du vieillissement.

- *Une augmentation de l'extraction splanchnique des acides aminés* est observée et ceci pourrait limiter la biodisponibilité postprandiale en acides aminés chez la personne âgée et en conséquence la réponse anabolique (Boirie et coll. 1997 ; Volpi et coll. 1999 ; Jourdan et coll. 2008).

- *Une dénervation* ainsi qu'une perte de la fonctionnalité des unités motrices est observée

tel-00719700, version 1 - 20 Jul 2012

au cours du vieillissement (Doherty et coll. 1993 ; Vandervoort 2002) et ceci entraînerait une moindre contractibilité des fibres musculaires.

- L'installation *d'une inflammation chronique à bas bruit* (Schaap et coll. 2006 ; Mayot et coll. 2007 ; Rieu et coll. 2009 ; Hamer & Molloy 2009 ; Bourdel-Marchasson et coll. 2010) pourrait également favoriser l'atrophie musculaire au cours du vieillissement en stimulant les voies de dégradation protéique et en inhibant la synthèse protéique musculaire.

- *Des dysfonctionnements mitochondriaux* pourraient avoir un rôle déterminant dans l'apparition de la sarcopénie (Hiona & Leewenburgh 2008) via la production d'espèces radicalaires, génératrices d'un stress oxydant.

- *Des apports nutritionnels inadaptés* aux besoins de l'organisme au cours du vieillissement pourraient influencer de manière négative la masse et la fonction musculaire (Bourdel-Marchasson et coll. 2001 ; Szulc et coll. 2004 ; Dreyer & Volpi 2005 ; Boirie 2009).

- Enfin, quelques études tendent à démontrer que le niveau de sarcopénie pourrait être déterminé très tôt au cours de la vie par *des facteurs d'ordre génétique*. Ainsi, le poids à la naissance ou à la puberté, ainsi que la taille à la puberté, détermineraient le niveau de sarcopénie chez l'individu âgé indépendamment du poids d'adulte (Sayer et coll. 2004 ; Kuh et coll. 2006). En effet, ces paramètres influenceraient fortement le capital maximal de masse musculaire à l'âge adulte.

3.2. Cinétique d'apparition de la sarcopénie : deux mécanismes possibles

L'intensité de la sarcopénie est sous la dépendance à la fois de la masse musculaire initiale et de la pente de décroissance de la masse musculaire.

Classiquement, les études chez l'homme s'accordent pour démontrer que la perte de masse musculaire serait lente, progressive et de faible intensité, commençant dès 20 ans et augmentant progressivement pour s'accentuer à partir de 60 ans *(voir § 1.2)*.

Cependant, la sarcopénie pourrait aussi résulter de pertes de masses beaucoup plus brutales, générées à la suite d'épisodes cataboliques. Ceux-ci seraient suivis par une récupération musculaire incomplète ou inexistante. Cette absence de récupération

tel-00719700, version 1 - 20 Jul 2012

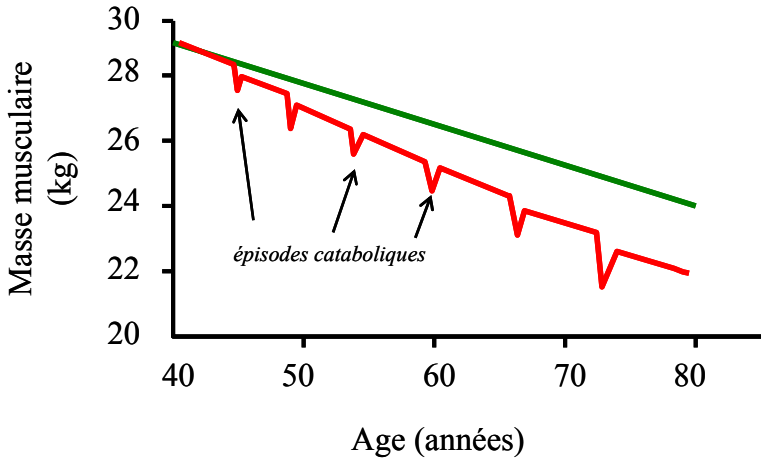


Figure 9 : Le « Catabolic crisis model » de la sarcopénie : un modèle de fonte musculaire accélérée *(d'après English & Paddon-Jones 2010).*

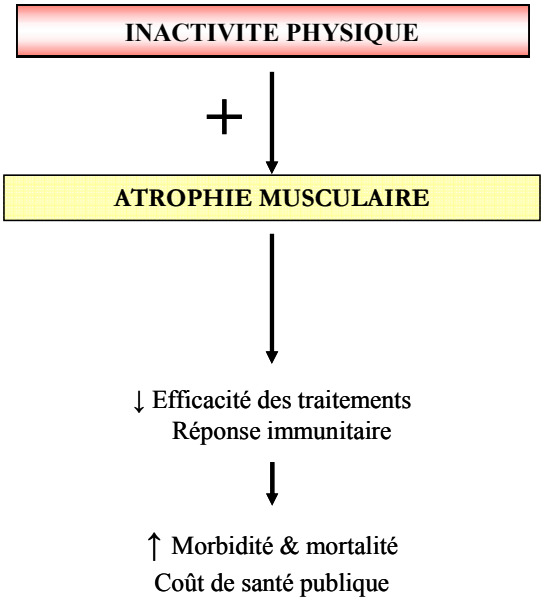


Figure 10 : Conséquences de l'inactivité physique/immobilisation.

tel-00719700, version 1 - 20 Jul 2012

musculaire à la suite d'épisodes cataboliques a pu être mise en évidence au cours du vieillissement dans différents modèles tels qu'un traitement aux glucocorticoïdes (Dardevet et coll. 1995) ou la privation alimentaire (Mosoni et coll. 1999). La succession de ces périodes et de ces pertes de masses non récupérées pourrait résulter en une perte de muscle significative pouvant accentuer la sarcopénie ou la créer. Ce modèle a été formalisé en 2010 par English & Paddon-Jones sous le nom de « catabolic crisis model » (English & Paddon-Jones 2010) (**Figure 9**).

3.3. Impact de l'inactivité physique sur la fonte musculaire

L'immobilisation est une situation courante imposée par une maladie, un accident, ou la sarcopénie elle-même. Il a été bien démontré que l'alitement induisait un certain nombre de modifications notamment une perte osseuse, une atrophie musculaire et une perte de force musculaire (Booth 1982 ; Blottner et coll. 2006 ; Pavy-Le Traon et coll. 2007) entrainant une perte de fonctionnalité et une faiblesse des muscles (Adams et coll. 2003 ; Fitts et coll. 2000) (**Figure 10**). Chez l'animal immobilisé, la perte de muscle commence dans les 72 premières heures d'immobilisation (Tesch et coll. 2008) et peut atteindre 30 à 60% de la masse initiale selon 1/ le modèle d'inactivité utilisé au cours de ces études (suspension, plâtrage, dénervation), 2/ la durée d'immobilisation (3 jours à 4 semaines) et 3/ le muscle affecté (*gastrocnemius*, *soleus*) (Thomason & Booth. 1990 ; Taillandier et coll. 1996 ; Pattison et coll. 2003a ; Coutinho et coll. 2004 ; Patterson et coll. 2006). Chez l'homme adulte, après 4 à 6 semaines d'alitement, la perte de volume des fibres musculaires peut atteindre 12 et 8% dans les muscles *gastrocnemius* et *vastus lateralis* respectivement (Berg et coll. 1997 ; Adams et coll. 2003 ; de Boer et coll. 2008).

Au niveau structural, l'inactivité physique entraînerait une réduction du nombre ou de la taille des fibres musculaires lentes oxydatives (fibres de type I) (Fitts et coll. 2000 ; Adams et coll. 2003). Par exemple, chez des sujets adultes, 2 à 5 semaines d'immobilisation vont réduire la surface des fibres d'environ 50% (en fait de 10 à 70% suivant la durée d'immobilisation et le type de fibres, les fibres lentes étant les plus touchées) (Thomason & Booth 1990). Cette réduction de taille et de surface des fibres semble unanimement retrouvée (Nicks et coll. 1989 ; Thomason & Booth 1990 ; Berg et coll. 1997) et serait la principale cause de l'atrophie musculaire et de la réduction de force qui en résulte (Hortobagyi et coll. 2000).

tel-00719700, version 1 - 20 Jul 2012

La réduction de l'activité physique est une situation fréquemment observée chez la personne âgée (Hollman et coll. 2007 ; Topinkova 2008). Il peut s'agir d'une diminution générale de l'activité physique (liée à une faiblesse musculaire ou une perte de l'équilibre) ou d'une diminution ponctuelle (à la suite d'une pathologie, par exemple). Ainsi, les personnes âgées se retrouvent très souvent alitées à la suite d'une maladie ou d'un traumatisme. L'atrophie musculaire générée par ces périodes d'alitement/immobilisation prolongées est plus importante chez un sujet âgé que chez un sujet jeune (Kortebein et coll. 2007 ; Yazawa et coll. 2007 ; Park et coll. 2010 ; Ikezoe et coll. 2010a-2010b). En effet, chez un sujet jeune, ces périodes d'immobilisation sont normalement suivies par une reprise de l'activité physique et une récupération de la masse musculaire, mais la réponse du muscle serait différente au cours du vieillissement. Ainsi, après 2 semaines d'immobilisation et 4 semaines de récupération musculaire, des sujets adultes récupèrent le volume musculaire d'avant immobilisation mais les sujets âgés ont une récupération incomplète (Suetta et coll. 2009) et les mêmes observations ont été faites chez l'animal (Booth 1978 ; Chakravarthy et coll. 2000 ; Zarzhevsky et coll. 2001a-2001b ; Childs et coll. 2003 ; Pattison et coll. 2003a). Ces pertes de masse musculaire non récupérées peuvent aggraver la sarcopénie (English & Paddon-Jones 2010). Or, si l'on sait que l'inactivité et l'âge entraînent une diminution de la force musculaire (Bruce et coll. 1989 ; Narici et coll. 1997), les mécanismes exacts impliqués dans les phases d'atrophie musculaire chez un sujet âgé immobilisé restent relativement inconnus et les mécanismes impliqués dans ces phases de non récupération musculaire sont totalement inconnus.

En conclusion, le vieillissement s'accompagne d'une perte de masse et de fonctionnalité musculaire, la sarcopénie, responsables d'une perte d'autonomie chez la personne âgée. La sarcopénie est un phénomène multifactoriel et peut résulter soit d'un processus lent et de faible intensité, soit d'épisodes cataboliques plus brutaux, suivis de périodes de récupération musculaire incomplètes et répétées au cours du temps. Ces situations pourraient se produire au cours des périodes d'alitement mais ont été relativement peu étudiées au cours du vieillissement, en particulier au cours des phases de récupération musculaire. Cependant, ces phases d'atrophie induites par l'inactivité physique résultent forcément d'un déséquilibre des taux de renouvellement protéique et cellulaire au niveau du muscle.

tel-00719700, version 1 - 20 Jul 2012

tel-00719700, version 1 - 20 Jul 2012

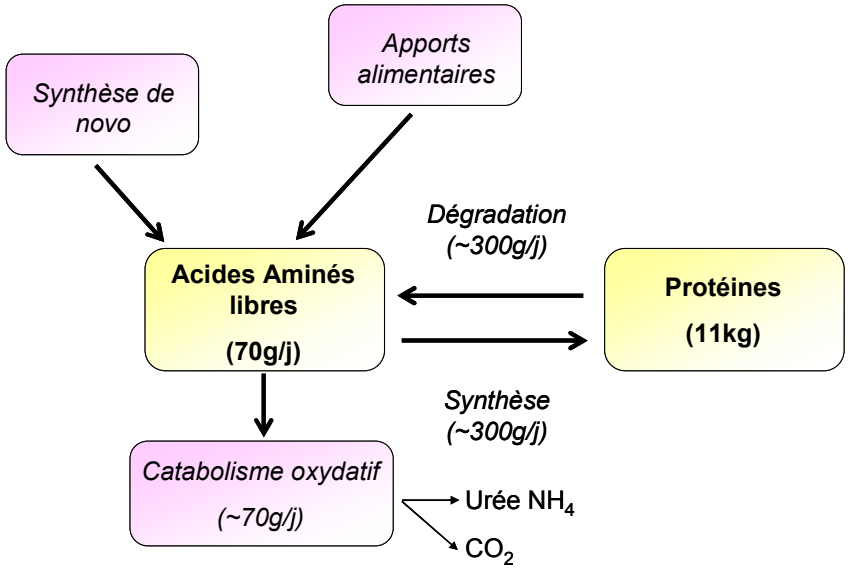


Figure 11 : Schéma général du métabolisme protéique pour un individu de 75 kg *(d'après Traité de nutrition artificielle de l'adulte).*

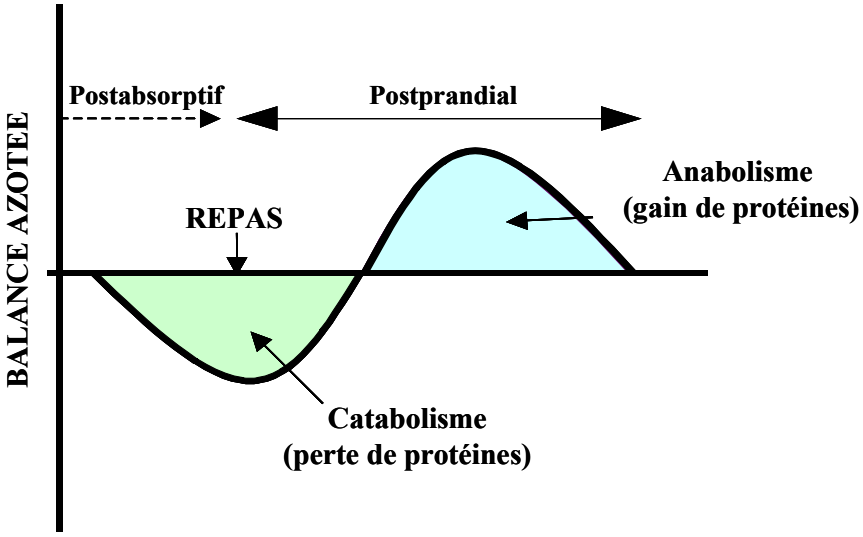


Figure 12 : Modulation de la balance azotée et du métabolisme protéique au cours de la journée *(d'après Dardevet et coll. 2011).*

Chapitre 2 : Mécanismes contrôlant la taille du compartiment musculaire : mécanismes physiologiques et modifications au cours du vieillissement et de l'inactivité physique

1. Le métabolisme protéique musculaire

Le muscle représente 40% des protéines totales de l'organisme. Le muscle influence donc fortement le métabolisme protéique au niveau corps entier. De plus, 85% du volume d'une fibre musculaire est constitué par les protéines myofibrillaires (Hoppeler 1986). Ces protéines musculaires se renouvellent en permanence à un rythme assez lent (~2%/jour chez l'homme et 4%/jour chez le rat). Chaque jour, ce sont environ 4g de protéines qui sont synthétisées puis dégradées par kg de masse corporelle (Mitch & Goldberg 1996) (**Figure 11**). Au niveau du corps entier, chez le jeune rat, le taux de renouvellement protéique musculaire représente 35% du renouvellement protéique total, contre 20% pour le tube digestif et 10% pour le foie. Afin de maintenir la masse musculaire constante, ce renouvellement nécessite donc un équilibre entre la dégradation et la synthèse des protéines dans le muscle.

Le renouvellement protéique joue un rôle majeur dans la régulation de la masse musculaire, mais aussi dans le maintien des capacités métaboliques et mécaniques normales du muscle (Attaix 2006). Le contenu protéique est donc très finement régulé au cours de la journée par la modulation des taux de synthèse et de dégradation des protéines (**Figure 12**). En *période postprandiale* (consécutive au repas), les acides aminés fournis par les protéines alimentaires affluent dans le plasma. Ils sont utilisés pour la synthèse des protéines corporelles qui vont alors être stockées : c'est l'anabolisme postprandial, caractérisé par une balance azotée positive. Ainsi, 72% de l'azote ingéré au cours du repas se retrouve au niveau corporel, dont 31% dans le muscle au cours de cette phase (Bos et coll. 2005). Au cours de la *période postabsorptive*, les protéines corporelles sont dégradées afin d'approvisionner les tissus en acides aminés ; il s'agit donc d'une période de catabolisme caractérisée par une balanze azotée négative. La taille du compartiment

tel-00719700, version 1 - 20 Jul 2012

musculaire varie donc au cours de la journée suivant cette cinétique. Chez un individu adulte ne cherchant pas à augmenter sa masse musculaire, l'anabolisme et le catabolisme sont en équilibre, le corrolaire étant une balance azotée journalière nulle.

1.1. La dégradation protéique

La dégradation des protéines ou protéolyse musculaire est un processus permettant de dégrader les protéines en leurs constituants de base : les acides aminés. Elle est réalisée selon trois mécanismes différents mais complémentaires : la voie lysosomale, la voie calcium-dépendante et la voie ubiquitine-protéasome-dépendante. En effet, si le système ubiquitine-protéasome-dépendant est responsable de la dégradation de l'actine et de la myosine, il ne peut pas dégrader les protéines myofibrillaires intactes (Solomon et Goldberg 1996). Le clivage initial des protéines myofibrillaires nécessite donc l'intervention des autres systèmes protéolytiques (Morris et coll. 2005).

1.1.1. La voie lysosomale et la voie calcium-dépendante

Ces deux voies protéolytiques ne comptent que pour 10 à 20% de la protéolyse musculaire totale et dégradent préférentiellement les protéines solubles (Mitch & Goldberg 1996 ; Attaix et coll. 1998).

1.1.1.1. La voie lysosomale

Les lysosomes sont de petites vésicules renfermant plus de 40 hydrolases (RNAses, DNAses, lipases, glycosidases et protéases) (Mortimore et coll. 1992). Ces vésicules cytoplasmiques monomembranaires ont un pH interne acide (4,5 à 5,5) (Holtzam 1989). Les protéases lysosomales (appelées cathepsines) ne contribuent pas de façon majoritaire à la dégradation des protéines myofibrillaires (Tiao et coll. 1994 ; Attaix et coll. 2005) car elles sont peu représentées dans le muscle. Les cathepsines majeures dans le muscle squelettique sont les cathepsines L, B, H (qui sont des cystéines protéinases) et la cathepsine D (qui est une aspartyl protéinase) (Kirschke et coll. 1983 ; Belkhou et coll. 1994 ; Bechet et coll. 1996). Elles sont principalement impliquées dans la dégradation de protéines membranaires ou extracellulaires (Jackman & Kandarian 2004).

Les cathepsines dégradent les protéines par trois mécanismes différents :

tel-00719700, version 1 - 20 Jul 2012

tel-00719700, version 1 - 20 Jul 2012

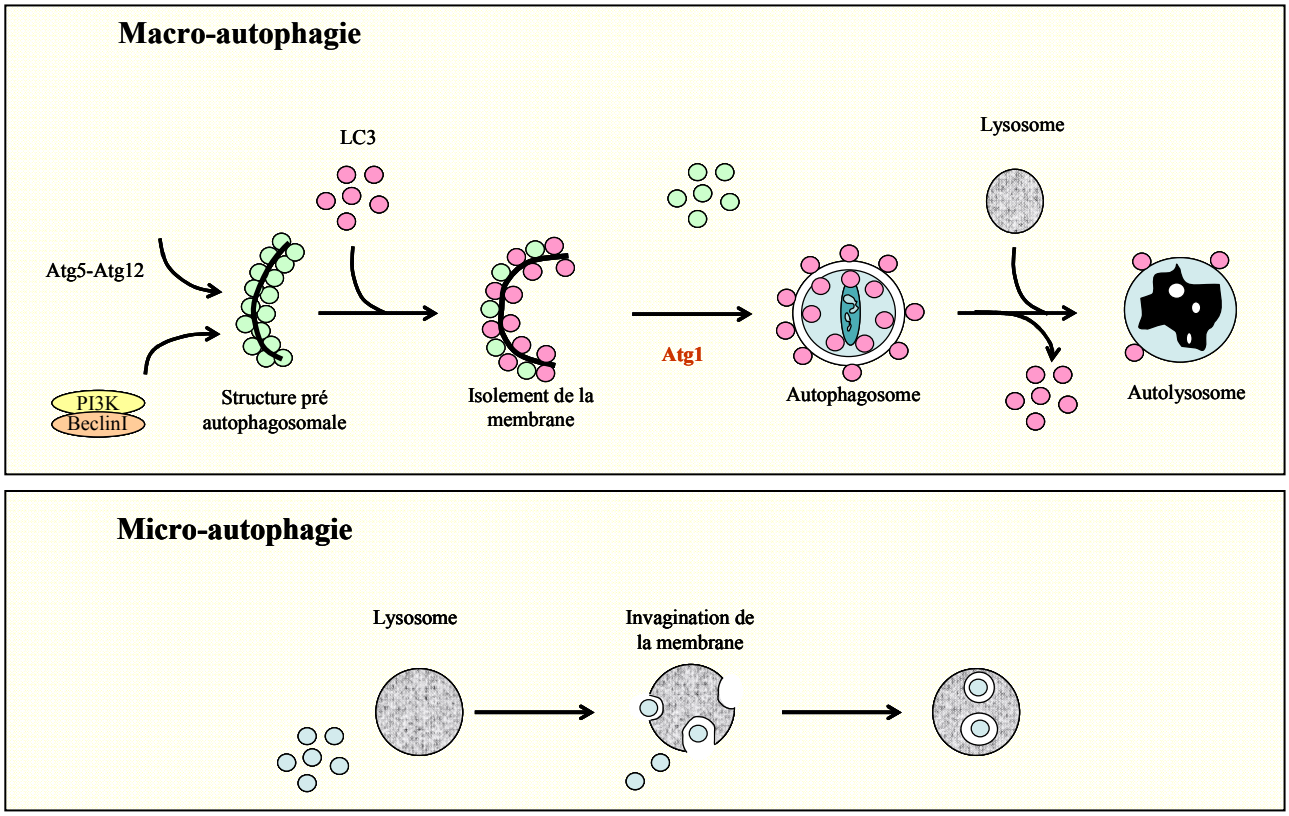


Figure 13 : Dégradation lysosomale : voies de l'autophagie *(d'après Béchet et coll. 2005).*

La *macro-autophagie* implique la formation de vésicules cytosoliques à double membrane, les autophagosomes, qui séquestrent des zones de cytoplasme et des organites. L'autophagosome fusionne avec le lysosome et le corps autophagique est libéré à l'intérieur de la lumière lysosomale pour que son contenu soit dégradé par les enzymes lysosomales. Ce processus implique des protéines Atg, Beclin1 et la protéine LC3, indispensables à la formation de l'autophagosome. Durant la *micro-autophagie*, les protéines cytosoliques sont internalisées dans le lysosome par invagination de la membrane lysosomale.

PI3K : Phosphatidyl-Inositol 3-Kinase, Atg : autophagy related, LC3 : microtubule-associated protein Light Chain 3

tel-00719700, version 1 - 20 Jul 2012

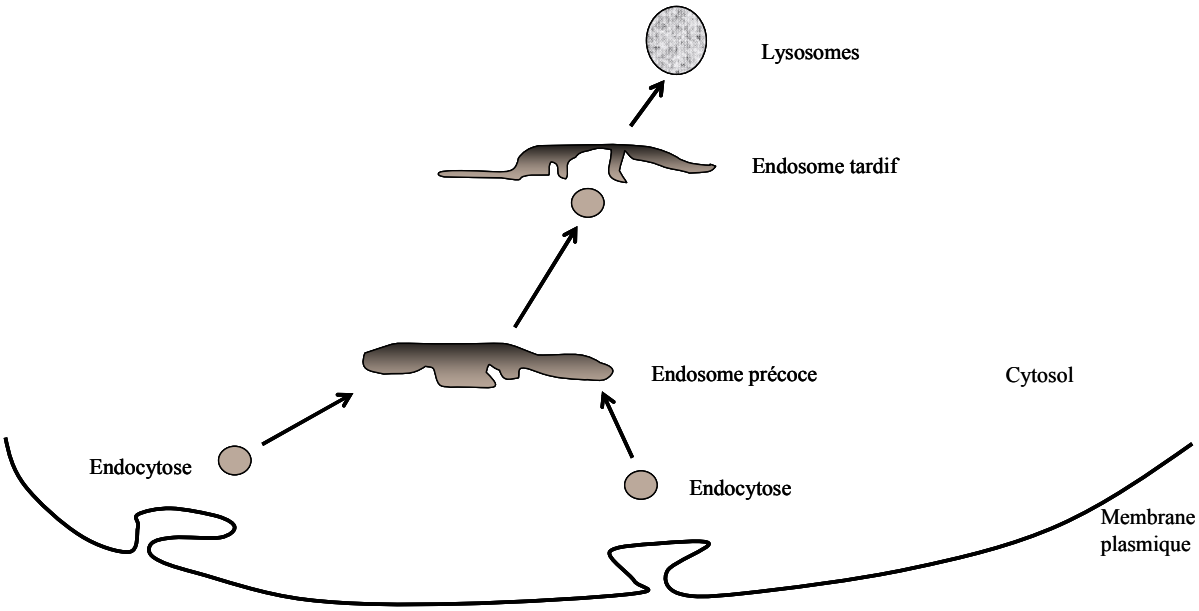


Figure 14 : Dégradation lysosomale : voie de l'hétérophagie *(d'après Béchet et coll. 2005).*
Au cours de l'hétérophagie, des protéines sont internalisées dans la cellule par endocytose pour devenir des endosomes précoces. Ceux-ci fusionnent alors entre eux pour donner des endosomes tardifs, qui fusionneront avec les lysosomes.

- *l'autophagie*, dans laquelle il peut être distingué la macro- et la micro-autophagie (**Figure 13**).

La macro-autophagie consiste en l'enroulement de la membrane de reticulum endoplasmique autour d'une partie du cytoplasme de la cellule, suivi de la fusion des vésicules ainsi formées avec les lysosomes. Il en résulte de nouveaux organites, les autophagosomes, dans lesquels se déroule la dégradation des protéines (Dunn 1990a-1990b). Les protéines impliquées dans l'autophagie sont appelées Atg (*Autophagy Related proteins*) et sont très conservées de la levure aux mammifères. La protéine Beclin1 régule la formation de l'autophagie. La formation des autophagosomes implique la protéine LC3 qui joue un rôle dans les étapes initiales de formation des vacuoles et dont une partie reste piegée à l'intérieur de ces compartiments (*microtubule-associated protein Light Chain 3*) (Kabeya et coll. 2000).

La micro-autophagie consiste en l'invagination de corps multivésiculaires d'origine endosomique ce qui permet l'internalisation des protéines ou des agrégats protéiques ; la fusion avec les lysosomes entraîne alors la dégradation de leur contenu (Haylett & Thilo 1991).

- *l'hétérophagie* correspond à la dégradation des protéines extracellulaires ayant pénétré par phagocytose, pinocytose ou endocytose (**Figure 14**). Les vésicules ainsi formées (hétérophagosomes), fusionnent ensuite avec les lysosomes. Ce processus est très important dans de nombreuses situations biologiques et notamment lors de la réponse inflammatoire ou immunitaire (présentation du motif antigénique), mais pas ou peu impliqué dans les atrophies musculaires (Fineschi & Miller 1997).

L'autophagie est induite dans des conditions de stress, de carrence en acides aminés, par traitement à la rapamycine (antibiotique de la famille des macrolides) et par des hormones stéroïdiennes (Munafo & Colombo 2001). Bien que relativement peu impliquées dans la protéolyse musculaire totale, certaines cathepsines, comme la cathepsine L, sont considérées comme de bons marqueurs de l'atropie musculaire. Son expression est augmentée très tôt au cours des atrophies musculaires quel que soit le modèle d'atrophie utilisé (Taillandier et coll. 1996 ; Deval et coll. 2001 ; Komamura et coll. 2003). Par exemple, dans un modèle animal de sepsis, les taux d'ARNm de la cathepsine L sont multipliés par 3 dans les muscles *gastrocnemius* et par 3,5 dans les muscles *tibialis anterior* après seulement 2 jours d'infection (Deval et coll. 2001).

tel-00719700, version 1 - 20 Jul 2012

1.1.1.2. La voie calcium-dépendante

La voie protéolytique calcium-dépendante implique deux grands types de cystéine protéases : les calpaïnes ubiquitaires et les calpaïnes tissu-spécifiques. Il existe à ce jour 14 calpaïnes identifiées chez les mammifères, les principales étant les µ- et m-calpaïnes (respectivement activées par des concentrations en calcium de l'ordre du µM et du mM) et la calpaïne 3 (spécifique du muscle) (Goll et coll. 2003). Les calpaïnes sont inactives en l'absence de stimuli cataboliques. Le calcium est le principal activateur de ces enzymes : sa fixation sur les calpaïnes entraine un changement de conformation de l'enzyme à l'origine de son activation. Ainsi, il a pu être démontré qu'un apport massif de calcium entraînait une forte protéolyse musculaire via cette voie des calpaïnes (Baracos et coll. 1986). D'autres facteurs comme les phospholipides (notamment le phosphatidylinositol) peuvent aussi réguler l'activition des calpaïnes par différents mécanismes, par exemple en diminuant la concentration en calcium nécessaire à l'autolyse des µ- et m-calpaïnes (Zalewska et coll. 2004 ; Shao et coll. 2006). Enfin, il existe un inhibiteur endogène spécifique des calpaïnes, la calpastatine (Goll et coll. 2003).

Les calpaïnes réalisent une protéolyse ménagée de leurs substrats, ce qui peut modifier leur état d'activation, leur localisation et leur fonction. Ces enzymes sont généralement activées à la suite de dommages cellulaires et lorsque la concentration en calcium intracellulaire devient élevée. Cependant, elles ne sont pas systématiquement activées en cas de perte musculaire et elles ne sont pas directement responsables de la dégradation des protéines contractiles majeures (actine et myosine) (Attaix et coll. 2005) mais interviendraient plutôt dans la déstructuration des sarcomères (Huang & Forsberg 1998 ; Solomon et coll 1998 ; Hasselgren & Fischer 2001).

1.1.2. La voie ubiquitine-protéasome-dépendante

Parmi les différents systèmes protéolytiques musculaires, le système ubiquitine-protéasome-dépendant est systématiquement activé lorsque le muscle s'atrophie de façon importante au cours de situations cataboliques sévères et il est aussi impliqué dans la dégradation des protéines contractiles majeures (actine et myosine) (Attaix et coll. 2005 ; Clarke et coll. 2007 ; Cohen et coll. 2009, Polge et coll. 2011). D'après des mesures de protéolyse réalisées sur muscles incubés à l'aide d'inhibiteurs de protéases, ce système

tel-00719700, version 1 - 20 Jul 2012

tel-00719700, version 1 - 20 Jul 2012

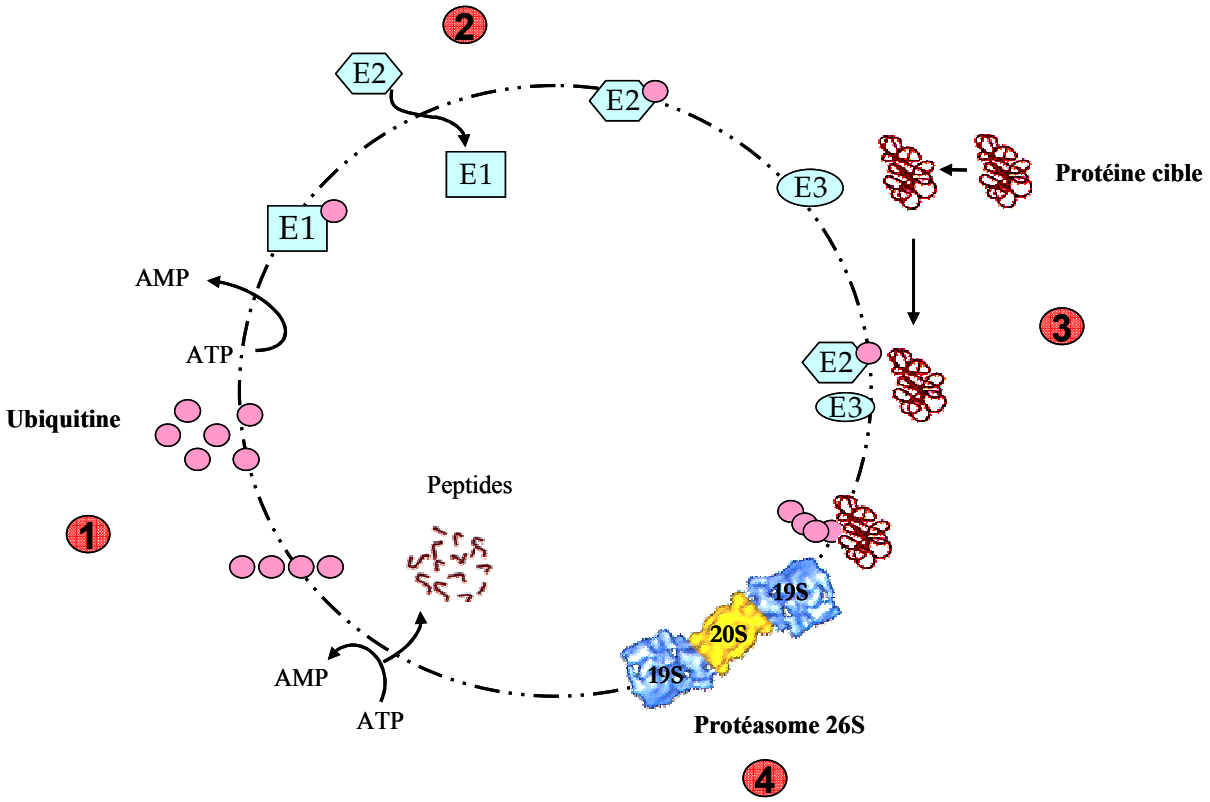


Figure 15 : Le système protéolytique ubiquitine-protéasome-dépendant.
La dégradation d'une protéine substrat par le système ubiquitine-protéasome-dépendant se déroule en plusieurs phases : 1/ Activation de l'ubiquitine par l'enzyme E1, 2/ Transfert de l'ubiquitine activée vers une enzyme de conjugaison E2, 3/ Reconnaissance de la protéine cible par une enzyme E3 ligase et liaison covalente de l'ubiquitine sur la protéine à dégrader, 4/ Polyubiquitination du substrat protéique et reconnaissance de la chaîne de polyubiquitine par le protéasome puis dégradation de la protéine polyubiquitinée.
ATP : Adénosine triphosphate, AMP : Adénosine monophosphate, E1 : enzyme d'activation, E2 : enzyme de conjugaison, E3 : enzyme ligase

compterait pour environ 80% des variations de la protéolyse musculaire totale (Attaix et coll. 1998 ; Mitch & Goldberg 1996).

La dégradation par ce système protéolytique se déroule en deux étapes : d'abord la polyubiquitination des substrats à dégrader, puis la dégradation proprement dite des protéines polyubiquitinées par le protéasome 26S (Attaix et coll. 2002) (**Figure 15**).

➢ *Polyubiquitination des protéines à dégrader*

Pour pouvoir être reconnues et dégradées par le protéasome 26S, les protéines cibles doivent être préalablement marquées par une chaîne de polyubiquitine. L'ubiquitine est une petite protéine de 76 acides aminés et environ 8500 Da et dont la localisation est ubiquitaire. Cette ubiquitine est d'abord activée par une enzyme d'activation E1 (*Ubiquitin-activating enzyme*) en présence d'ATP (**Figure 15**). Cette activation passe tout d'abord par la liaison covalente de l'enzyme E1 sur l'ubiquitine, puis le transfert de l'ubiquitine sur un autre site de l'enzyme E1. L'ubiquitine ainsi activée est ensuite transférée sur une enzyme de conjugaison E2 (*Ubiquitin-conjugating enzyme*) par une réaction de trans-estérification. Cette enzyme E2 peut, seule ou de concert avec une enzyme E3 ligase (qui reconnaît le substrat protéique), lier de façon covalente l'ubiquitine au substrat protéique. Cette liaison se fait sur un résidu lysine de la protéine. D'autres molécules d'ubiquitine peuvent ensuite se lier à d'autres résidus lysine de l'ubiquitine déjà présente. Lorsque la chaîne de polyubiquitine est composée d'au moins 4 molécules d'ubiquitine, elle peut être reconnue par le protéasome 26S (Thrower et coll. 2000 ; Attaix et coll. 2002).

Il existe chez l'homme 2 isoformes de l'enzyme E1 (de 110 kDa et 117 kDa) et plus de 30 isoformes de l'enzyme E2 (de 14 à 35 kDa). Les enzymes E3 ligases sont responsables de la reconnaissance spécifique des protéines cibles à polyubiquitiner. Il en existe plus d'une centaine, ce qui permettrait d'expliquer l'implication de la voie ubiquitine-protéasome-dépendante dans de nombreuses voies de régulations métaboliques. Des enzymes E3 ligases spécifiques du muscle, MuRF1 (*Muscle Ring Finger 1*) et MAFbx (*Muscle Atrophy Fbox*)/Atrogin-1, ont été récemment identifiées comme des marqueurs de l'atrophie musculaire (Bodine et coll. 2001 ; Latres et coll. 2005). Ainsi, leur activation est souvent associée à la dégradation de protéines constitutives du muscle. Cependant, les seules cibles connues de l'enzyme MAFbx/Atrogin-1 sont la protéine eIF3F, l'une des

tel-00719700, version 1 - 20 Jul 2012

tel-00719700, version 1 - 20 Jul 2012

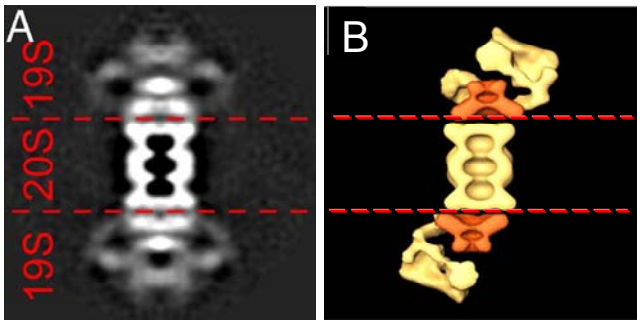


Figure 16 : Le protéasome 26S présenté en 2 dimensions par microscopie (*A*) et par modélisation (*B*) *(d'après Nickell et coll. 2009).*

sous-unités du facteur de traduction des protéines eIF3 (Csibi et coll. 2009) ainsi que le facteur de différenciation musculaire MyoD (Tintignac et coll. 2005). En orientant ces différentes protéines vers la dégradation par le protéasome, cette enzyme peut donc également être considérée comme un index de l'anabolisme musculaire (Attaix & Baracos 2010).

➢ *Dégradation des protéines polyubiquitinées par le protésome 26S*

Les protéines polyubiquitinées sont reconnues par le protéasome 26S puis dégradées en tripeptides par celui-ci. Les tripeptides sont ensuite pris en charge par d'autres peptidases puis dégradés en leurs constituants fondamentaux : les acides aminés (**Figure 15**). L'ubiquitine est ensuite recyclée par action d'enzymes de dé-ubiquitination qui clivent les liaisons de l'ubiquitine.

Le protéasome 26S est un complexe multicatalytique de haut poids moléculaire (2500 kDa), dont l'activité est ATP-dépendante. Il est formé d'un core catalytique, le protéasome 20S et de deux complexes régulateurs 19S (Attaix et coll. 2005) (**Figure 16**). Il dégrade les protéines anormales ou endommagées, mais aussi de nombreuses protéines impliquées dans le cycle cellulaire ou la transcription des gènes.

Les complexes régulateurs 19S sont composés de 18 sous-unités chacun. Ces complexes peuvent s'associer aux extrémités du protéasome 20S en présence d'ATP pour former le protéasome 26S (Coux et coll. 1996 ; Voges et coll. 1999). Ces complexes reconnaissent les chaînes de poly-ubiquitines, déplient le substrat protéique, l'injectent dans le core catalytique et fournissent l'énergie nécessaire au protéasome 20S pour dégrader les protéines en peptides de 3 à 20 acides aminés (en hydrolysant l'ATP). Ceux-ci sont pris en charge par des peptidases pour générer des acides aminés libres.

Le protéasome 20S est composé de 14 sous-unités différentes assemblées en 4 anneaux de 7 sous-unités. Il s'agit de la partie catalytique du protéasome 26S. Il possède au moins 5 activités peptidasiques et protéolytiques, dont les 3 principales sont : l'activité chymotrypsin-like (clivant préférentiellement la chaîne polypeptidique cible après les acides aminés hydrophobes), l'activité trypsin-like (hydrolysant les résidus basiques) et l'activité caspase-like ou PGPH (*PeptidylGlutamyl Peptide Hydrolase*) (clivant après les acides aminés acides) (Orlowski et coll. 1993 ; Cardozo et coll. 1994). Les deux autres

tel-00719700, version 1 - 20 Jul 2012

tel-00719700, version 1 - 20 Jul 2012

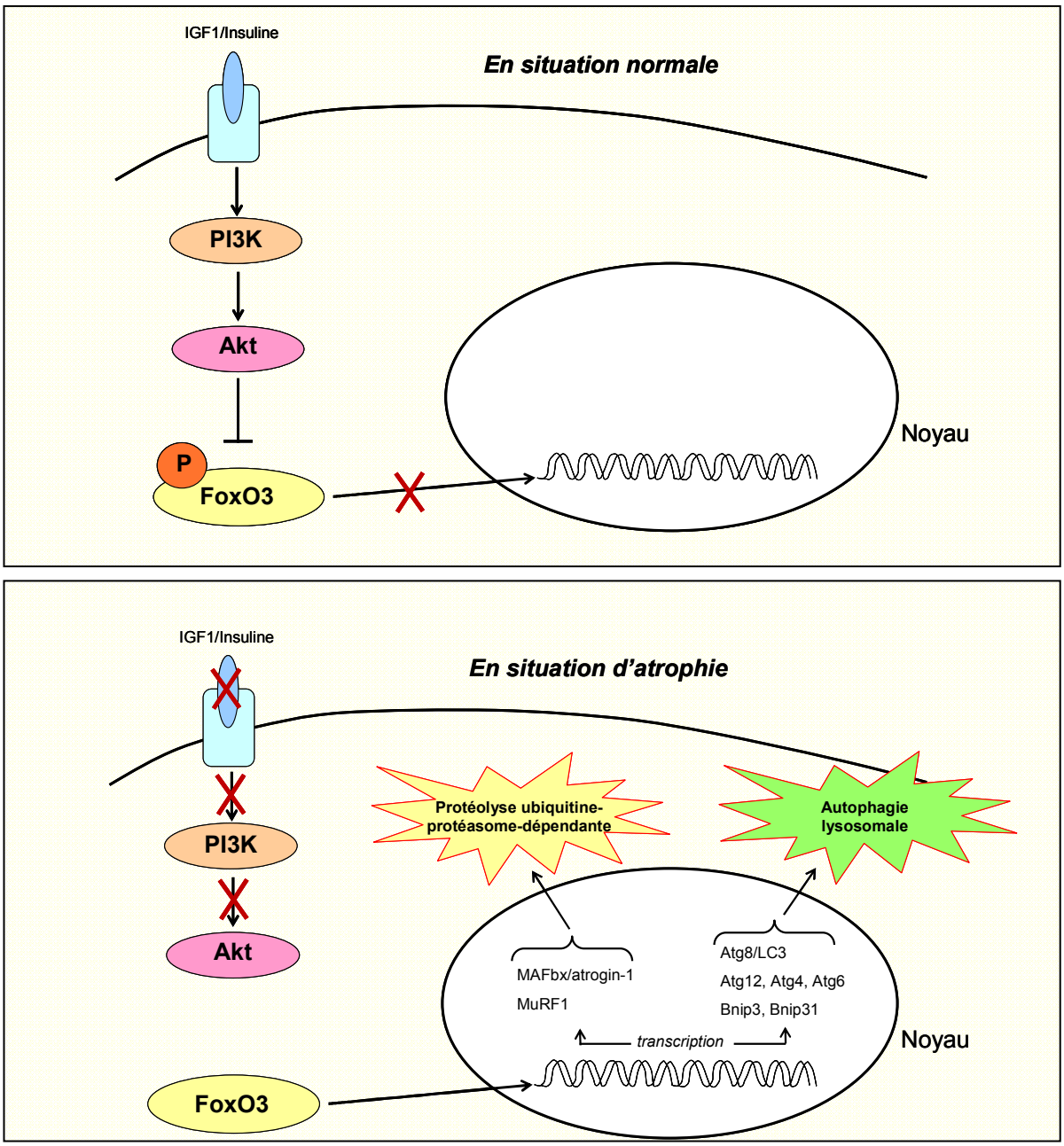


Figure 17 : Rôle central des facteurs de transcription FoxO dans les phénomènes protéolytiques *(d'après Attaix & Béchet 2007).*
En situation physiologique (c'est-à-dire en l'absence de processus d'atrophie musculaire), les facteurs de transcription FoxO sont phosphorylés par la protéine kinase Akt, rendant leur translocation dans le noyau impossible. Lors d'une situation d'atrophie, la voie de signalisation menant à l'activation d'Akt est perturbée, rendant cette enzyme inactive. Les facteurs de transcription FoxO peuvent alors transloquer dans le noyau et induire la transcription de gènes impliqués dans la protéolyse ubiquitine-protéasome-dépendante (comme les gènes codant pour les enzymes E3 ligases MAFbx/Atrogin-1 et MuRF1), ou dans l'autophagie lysosomale (comme les gènes codant pour les protéines Atg ou LC3, impliquées dans la formation des autophagosomes).
IGF-1 : insulin-like growth factor 1, PI3K : Phosphatidyl-Inositol 3-Kinase, FoxO : Forkhead Box O, MuRF1 : Muscle Ring Finger 1, MAFbx : Muscle Atrophy Fbox, Atg : autophagy related, LC3 : microtubule-associated protein light chain

activités concernent le clivage spécifique des petits acides aminés neutres et des acides aminés à chaînes ramifiées (Orlowski et coll. 1993 ; Cardozo et coll. 1994).

1.1.3. Coopération des différents systémes protéolytiques

Du fait de leurs fonctions différentes dans la dégradation des protéines musculaires (déstructuration de l'architecture musculaire ou dégradation proprement dite des protéines), les différents systèmes protéolytiques pourraient coopèrer au cours des phénomènes d'atrophie musculaire.

Les calpaïnes, par exemple, sont impliquées dans la régulation de la voie ubiquitine-protéasome-dépendante. La disponibilité des substrats à dégrader, l'un des facteurs régulant l'activité du système ubiquitine-protéasome-dépendant pourrait être augmentée par les calpaïnes (Li et coll. 2004) et les voies régulant l'activité des calpaïnes pourraient activer le protéasome (Galvez et coll. 2007). Une étude de Smith et coll. semble confirmer ces observations en démontrant que l'activation des calpaïnes augmenterait l'activité protéolytique du protéasome et qu'au contraire, l'inhibition de ce dernier par de l'epoxomicine bloquerait la dégradation par le système des calpaïnes (Smith et Dodd. 2007).

La protéolyse ubiquitine-protéasome-dépendante peut aussi être reliée à l'autophagie. Des facteurs de transcription appelés FoxO (*Forkhead Box O*) semblent en effet relier ces deux voies (**Figure 17**). Ces facteurs de transcription, au nombre de 4 chez les mammifères (FoxO1, FoxO3a, FoxO4 et FoxO6) sont impliqués dans de nombreux processus biologiques dont l'arrêt du cycle cellulaire, la réparation de l'ADN, l'apoptose, l'autophagie (Greer & Bruner 2005 ; Zhao et coll. 2007) ou la protéolyse ubiquitine-protéasome-dépendante (via la régulation de l'expression de nombreux gènes dont ceux des enzymes E3 ligases MAFbx/atrogin-1 et MuRF1 (Sandri et coll. 2004 ; Zhao et coll. 2007 ; Senf et coll. 2010 ; Brault et coll. 2010). De récentes études réalisées sur des myocytes *in vitro* tendent notamment à démontrer l'implication du facteur FoxO3a dans l'induction de l'autophagie (Zhao et coll. 2007 ; Mammucari et coll. 2007) en stimulant la transcription d'Atg ou du LC3 (des marqueurs membranaires des vésicules d'autophagie). Une fois phosphorylées sur plusieurs sites par différentes kinase notamment la protéine Akt (ou *Protéine Kinase B* : PKB) (Stitt et coll. 2004), les protéines FoxO ne peuvent plus rentrer dans le noyau et jouer leur rôle de facteurs de transcription (Brunet et coll. 1999 ;

tel-00719700, version 1 - 20 Jul 2012

tel-00719700, version 1 - 20 Jul 2012

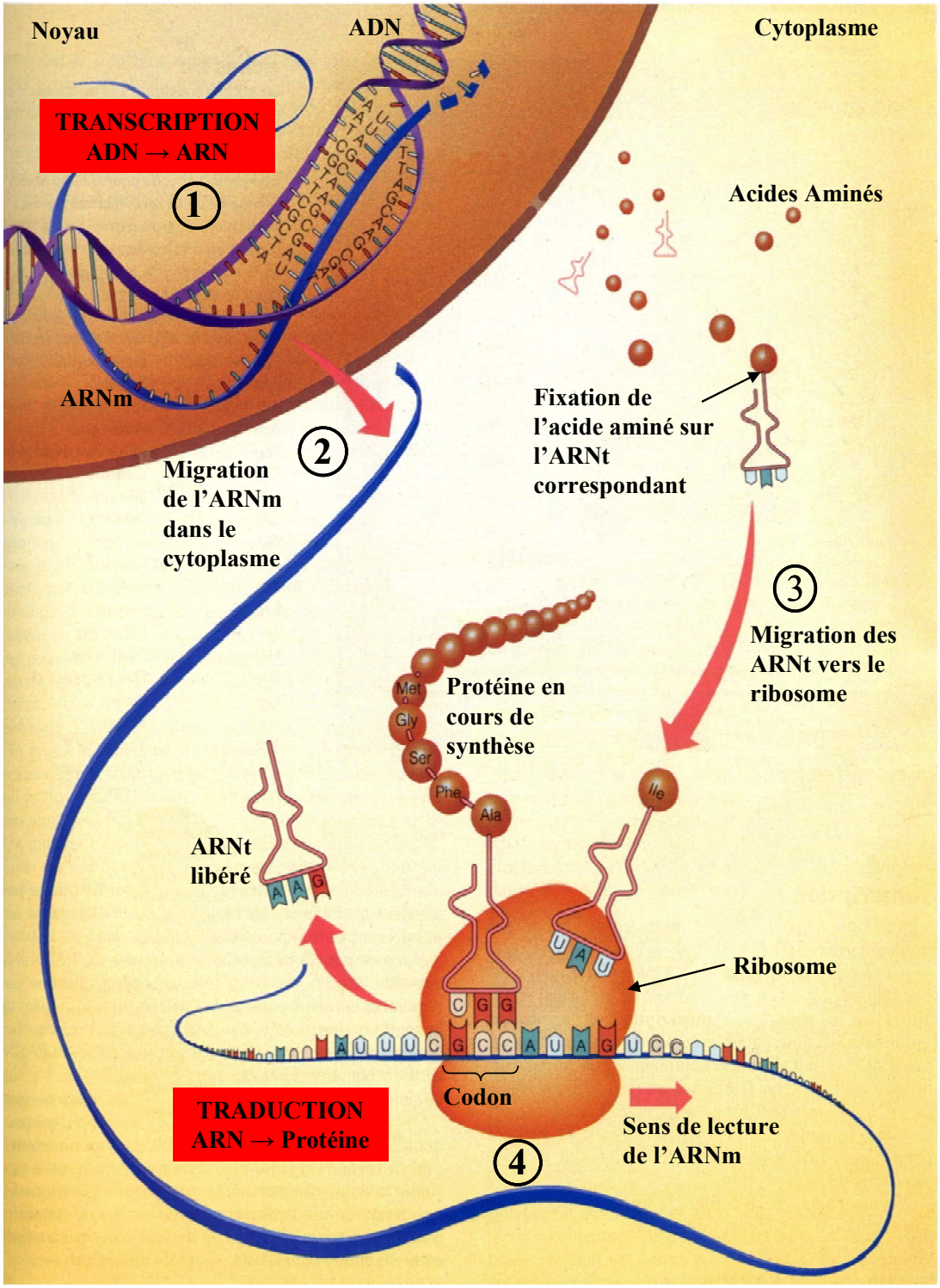


Figure 18 : Représentation schématique de la synthèse des protéines dans la cellule. Cette synthèse se décompose en 4 étapes : 1) Copie de l'ADN en ARNm dans le noyau (**transcription**), 2) Migration de l'ARNm du noyau au cytoplasme, 3) Migration de l'ARNt qui transporte un acide aminé vers le brin d'ARN et le ribosome et 4) **traduction** de l'ARNm en protéine grâce à l'apport de l'acide aminé par l'ARNt et la progression du ribosome le long de l'ARNm.

ARNt : Acide ribonucléique de transfert, ARNm : Acide ribonucléique messager, ADN : Acide désoxyribonucléique

tel-00719700, version 1 - 20 Jul 2012

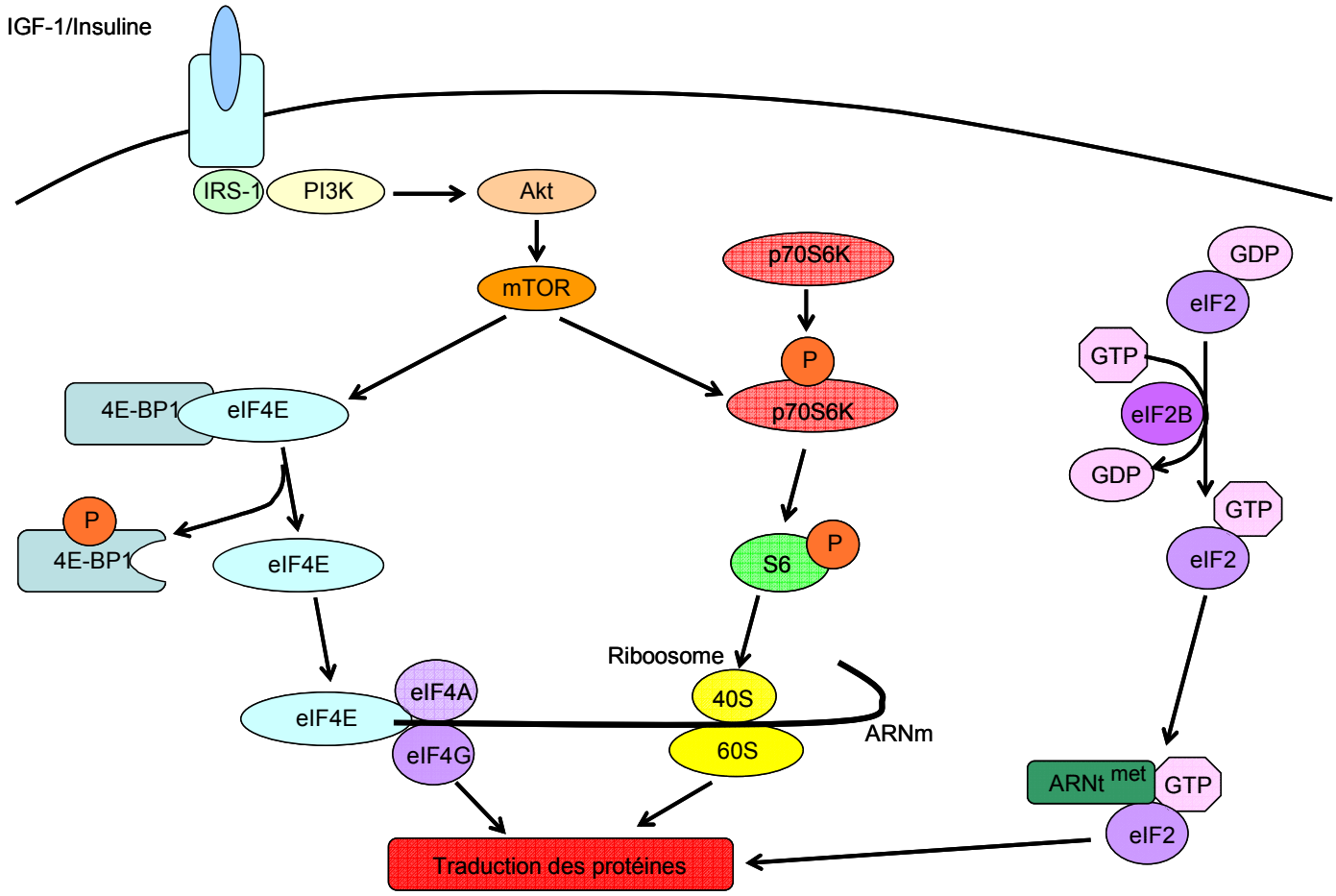


Figure 19 : Etape d'initiation de la traduction des protéines *(d'après Liu et coll. 2002).*

IGF-1 : insulin-like growth factor 1, IRS-1: Insulin receptor substrate 1, PI3K : Phosphatidyl-Inositol 3-Kinase, mTOR : mammalian Target of Rapamycin, ARNm :Acide ribonucléique messager, ARNt : Acide ribonucléique de transfert, Met : méthionine, GDP : Guanosine diphosphate, GTP : Guanosine triphosphate

Tran et coll. 2003). Cependant, il existe certains cas dans lesquels les protéines FoxO, phosphorylées par d'autres kinases comme JNK, qui antagonise l'action d'Akt, peuvent transloquer dans le noyau (Greer & Brunet 2005).

1.2. La synthèse protéique

1.2.1. Généralités

La synthèse protéique consiste en l'assemblage des acides aminés en chaînes de polypeptides. La synthèse débute dans le cytoplasme à partir des ARN messagers (ARNm) issus de la transcription des gènes, des ribosomes, des acides aminés fixés sur les ARN de transfert (ARNt) et de nombreux facteurs protéiques spécifiques des différentes étapes : c'est la *traduction des protéines*, c'est-à-dire la synthèse proprement dite des protéines à partir de l'ARNm. Les 3 étapes de la traduction sont l'initiation, l'élongation, et la terminaison (**Figure 18**).

L'initiation correspond à l'assemblage des sous-unités 40S et 60S du ribosome au niveau du codon d'initiation (AUG) de l'ARNm (**Figure 18 et Figure 19**) et à la fixation de l'ARNt chargé avec la méthionine (qui est toujours le premier acide aminé lors de la synthèse d'une protéine).

Cette étape est contrôlée par un certain nombre de protéines, dont le facteur eIF2 qui est impliqué dans la fixation de l'ARNt initiateur à la sous-unité 40S du ribosome pour former le complexe de pré-initiation 43S.

Une autre protéine régulatrice de cette voie est la protéine 4E-BP1, qui agit comme un inhibiteur de l'initiation de la traduction. Sous sa forme normale, ce facteur lie un autre facteur d'initiation (eIF4E) qui n'est plus disponible pour jouer son rôle dans l'initiation de la traduction (**Figure 19**). En effet, ce n'est que sous sa forme libre qu'il peut s'associer avec eIF4G pour former le complexe eIF4F, composant actif de l'initiation de la traduction. La phosphorylation de 4E-BP1 provoque la libération de eIF4E et donc la formation du complexe eIF4F (Wang & Proud 2006). Ce complexe permet la reconnaissance et l'association de l'ARNm avec le complexe de pré-initiation 43S, ce qui initie la traduction (Pain 1996). Ainsi, il existe une corrélation entre la stimulation de la synthèse protéique musculaire et l'augmentation de phosphorylation de 4E-BP1 (Yoshizawa et coll. 1997-1998).

tel-00719700, version 1 - 20 Jul 2012

tel-00719700, version 1 - 20 Jul 2012

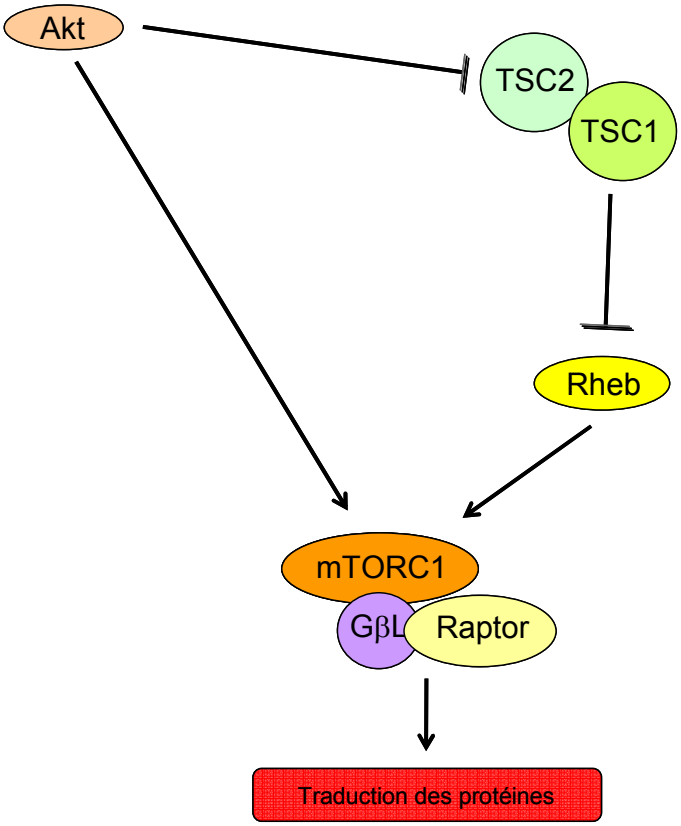


Figure 20 : Schéma simplifié de la voie d'activation de mTORC1 *(d'après Drummond 2009).*
mTORC1 : complexe mammalian Target of Rapamycin 1, TSC1 et TSC2 : tuberous sclerosis complex 1 et 2, Raptor : Regulatory associated protein of mTOR, Gβ1 : G proteine β-subunit-like

Enfin, on peut citer comme régulateur de cette étape, la protéine S6K1 (ou p70S6kinase ou p70S6K). Cette kinase de 70 kDa est elle-même activée par phosphorylation. Elle a comme substrat la protéine ribosomale S6, qui est un élément constitutif de la sous-unité 40S du ribosome (Kimball et coll. 1999 ; Anthony et coll. 2000a ; Jastrzebski et coll. 2007 ; Hornberger et coll. 2007 ; Roux et coll. 2007).

L'élongation permet l'allongement de la chaîne polypeptidique par la répétition du cycle consistant à accrocher l'aminoacyl-ARNt spécifique du codon suivant dans le ribosome, à former la liaison peptidique, et à avancer le ribosome sur l'ARNm.

Parmi les facteurs régulateurs de cette étape, la protéine eEF2 est l'une des mieux décrites. Elle intervient au cours de l'étape de translocation, c'est-à-dire lorsque le ribosome se déplace le long de l'ARNm. Sa régulation passe par un mécanisme de phosphorylation/déphosphorylation complexe (Carlberg et coll. 1990 ; Wang et coll. 2001). Sous sa forme phosphorylée, eEF2 est inactive et liée à du GTP ; sa déphosphorylation entraîne son activation.

La terminaison est l'étape pendant laquelle le polypeptide complet est relargué dans le cytoplasme où il subira des modifications post-traductionnelles.

1.2.2. Voies de signalisation de la synthèse des protéines

La protéine mTOR (*mammalian Target of Rapamycin*) est l'élément central de la voie menant à la synthèse des protéines en particulier au niveau de l'étape de traduction (**Figure 19**). Il s'agit d'une sérine-thréonine kinase de 290 kDa. L'utilisation d'un inhibiteur spécifique, la rapamycine, a permis de montrer que son activation induisait la phospshorylation activatrice des deux acteurs clés de la synthèse protéique : 4E-BP1 et S6K1 (p70S6K1), permettant ainsi l'initiation de la traduction des protéines (Bolster et coll. 2004 ; Karlsson et coll. 2004 ; Cuthbertson et coll. 2005 ; Dreyer & Volpi 2005).

La protéine mTOR peut s'associer à d'autres protéines pour former deux complexes : les complexes mTORC1 et mTORC2 (**Figure 20**) mais seul mTORC1 est sensible à la rapamycine. Le complexe mTORC1 est constitué de mTOR, Raptor (*Regulatory associated protein of mTOR*) et Gβ1 (*G proteine β-subunit-like*) et le complexe mTORC2 est constitué de mTOR, de rictor (*rapamycin-insensitiv companion of m-TOR*), SIN1 (*stress-activated-protein-kinase-interacting protein 1*) et Gβ1. Le complexe mTORC1 est un régulateur des cellules musculaires squelettiques au cours des processus d'hypertrophie

tel-00719700, version 1 - 20 Jul 2012

(Bodine et coll. 2001). La régulation de mTORC2 est moins bien connue mais ne semble pas intervenir dans l'initation et l'élongation de la synthèse protéique (Sarbassov et coll. 2006).

La voie de signalisation de mTOR est activée entre autres par des hormones comme l'insuline et des acides aminés, en particulier la leucine (Kimball & Jefferson 2001 ; Proud 2004). Brièvement, avec l'insuline la protéine mTOR est activée par phosphorylation par la kinase Akt (Avruch et coll. 2006 ; Proud 2006), elle-même activée par la PI3K (*phosphatidyl-inositol 3-kinase*) (**Figure 19**). La kinase Akt peut activer mTORC1 directement par phosphorylation (Nave et coll, 1999) ou indirectement en phosphorylant (et ainsi en inhibant) la protéine TSC2 (*tuberous sclerosis complex 2*) (Inoki et coll. 2002 ; Manning et coll. 2002) ceci provoquant la dissociation du complexe TSC1-TSC2 et levant son effet inhibiteur sur mTOR (Kwiatkowski & Manning 2005) par l'activation de la protéine Rheb (Tremblay et coll. 2005) (**Figure 20**). Avec la leucine, les voies de signalisation conduisant à l'activation de mTORC1 sont encore mal connues voire inconnues.

Il existe de plus une régulation fine à la fois de la synthèse protéique musculaire et de la protéolyse ubiquitine-protéasome-dépendante. Ainsi, l'activation de la voie PI3K/Akt entraine aussi la phosphorylation des facteurs de transcription FoxO (Brunet et coll. 1999 ; Tran et coll. 2003 ; Van Der Heide et coll. 2004), ainsi rendus inactifs car ils sont alors incapables de rentrer dans le noyau pour se fixer à l'ADN.

2. Contrôle de la masse cellulaire

La taille du compartiment musculaire dépend du taux de renouvellement protéique mais aussi du taux de renouvellement cellulaire du muscle. En effet, il existe normalement un équilibre entre l'élimination des cellules par apoptose (processus physiologique différent de la nécrose) et la régénération/différenciation des cellules musculaires.

2.1. L'apoptose ou mort cellulaire programmée

L'apoptose ou mort cellulaire programmée est un processus défini comme l'auto-destruction physiologique des cellules. L'apoptose est un processus physiologique qui permet de contrôler le nombre de cellules d'un tissu en assurant l'élimination de cellules mal localisées, mal conformées ou de cellules indésirables dans un tissu. Il s'agit donc d'un

tel-00719700, version 1 - 20 Jul 2012

tel-00719700, version 1 - 20 Jul 2012

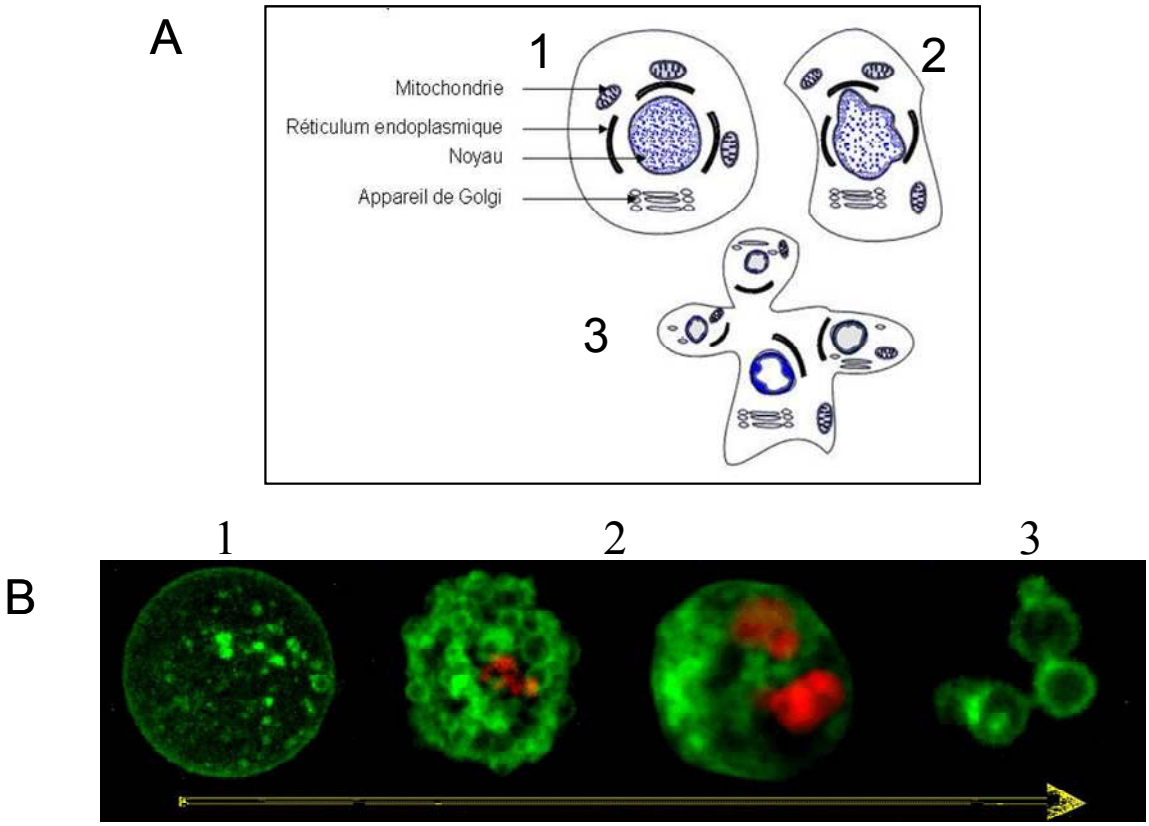


Figure 21 : Apoptose cellulaire : représentation schématique (*A*) et visualisation d'une cellule en apoptose par immunofluorescence (*B*).
Dans une cellule normale (1), l'apoptose se caractérise par la condensation du cytoplasme et de la chromatine, puis une fragmentation de l'ADN et le bourgeonnement de la membrane plasmique (2). De ces différents processus, résulte la formation de corps apoptotiques (3) qui sont rapidement phagocytés.
ADN :Acide désoxyribonucléique

phénomène majeur dans le contrôle de l'homéostasie cellulaire et tissulaire de l'organisme. Ainsi, l'apoptose cellulaire non contrôlée pourrait être impliquée dans un certain nombre de situations physiopathologiques (vieillissement, maladies neuro-dégénératives, cancers).

Dans le muscle, l'apotose est responsable de l'élimination des noyaux des myocytes. La modulation du nombre de noyaux d'une fibre musculaire est un moyen de contrôler sa taille et ses caractéristiques (Allen et coll. 1999 ; Favier et coll. 2007). C'est la théorie du domaine myonucléaire, soit le rapport cytoplasme/nombre de noyaux.

L'apoptose est caractérisée par une succession de modifications morphologiques dues à des changements moléculaires et biochimiques. Ainsi, au cours des processus apoptotiques, les mitochondries subissent un certain nombre de dommages avec, notamment, le relargage de facteurs pro-apoptotiques dans le cytoplasme, comme le cytochrome c. Après condensation de la chromatine, des endonucléases vont entraîner une fragmentation de l'ADN, une augmentation de la protéolyse, une déstructuration de la membrane qui va conduire à une fragmentation de la cellule (**Figure 21**).

Les processus apoptotiques font intervenir des protéases cytoplasmiques appelées caspases. Ces protéines sont des cystéines protéinases et sont constituées de 3 domaines : un pro-domaine (en N-terminal), une grande sous-unité et une petite sous-unité (en C-terminal). Les caspases sont synthétisées sous formes de pro-enzymes inactives, les pro-caspases (Danial & Korsmeyer 2004). Leur activation se fait par clivage de leur chaîne protéique de chaque côté de la grande sous-unité. Il existe 3 groupes de caspases : d'une part un groupe qui participe à la maturation des cytokines (caspases- 1,-4 et -5 chez l'homme, caspases-1, -11 et -12 chez la souris), le groupe des caspases initiatrices (caspases-2, -8, -9 et -10) et le groupe des caspases effectrices (caspases-3, -6 et -7). Les caspases initiatrices activent les caspases effectrices qui vont jouer leur rôle de dessassemblage de la cellule (Thornberry & Lazebnik 1998 ; Fuentes-Prior & Salvesen 2004) en activant d'autres protéases (Fuentes-Prior & Salvesen 2004). Par exemple la pro-caspase-3 peut être activée par les caspases-8 et -9 (Boatright & Salvesen 2003) et la caspase-12 (Morishima et coll 2002 ; Hitomi et coll 2004). La caspase-3 est responsable de la condensation de la chromatine, de la fragmentation de l'ADN et de la mort cellulaire (Cohen 1997 ; Kujawa et coll. 2005). Elle est aussi responsable de l'activation de la « cascade des caspases », c'est-à-dire de l'activation des caspases-6 et -7, qui vont elles-mêmes cliver d'autres protéines du noyau, menant ainsi à la destructuration de celui-ci. Il

tel-00719700, version 1 - 20 Jul 2012

tel-00719700, version 1 - 20 Jul 2012

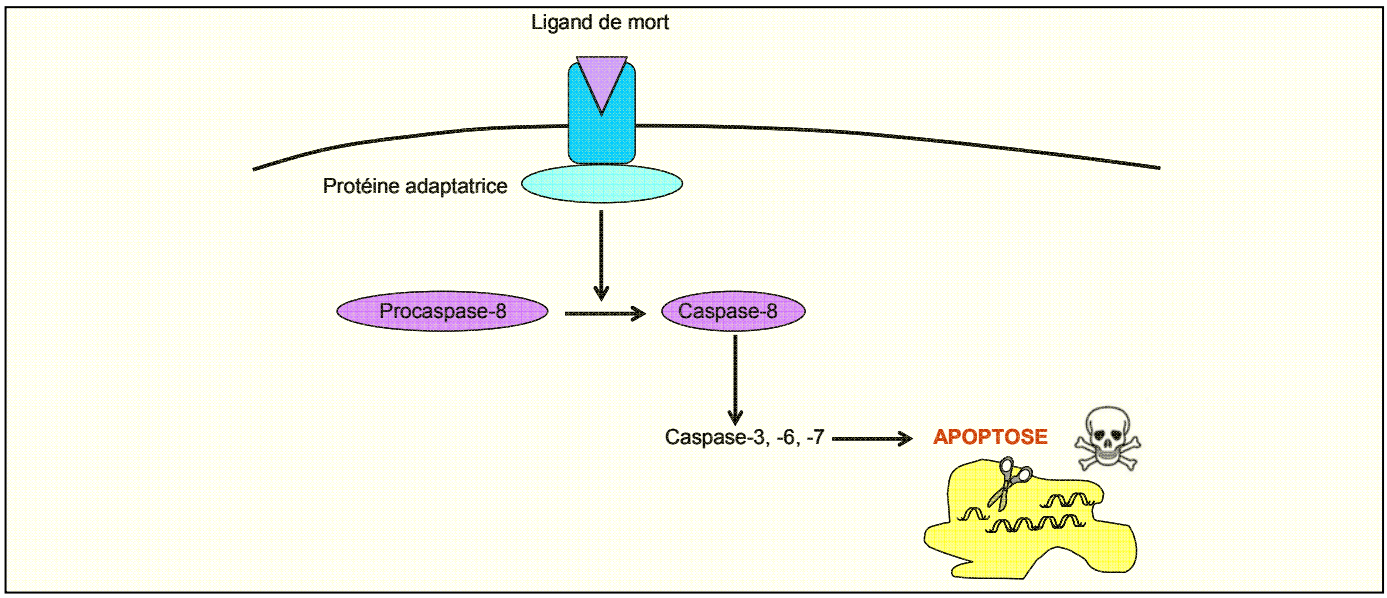


Figure 22 : Voie extrinsèque des récepteurs de mort de l'apoptose.

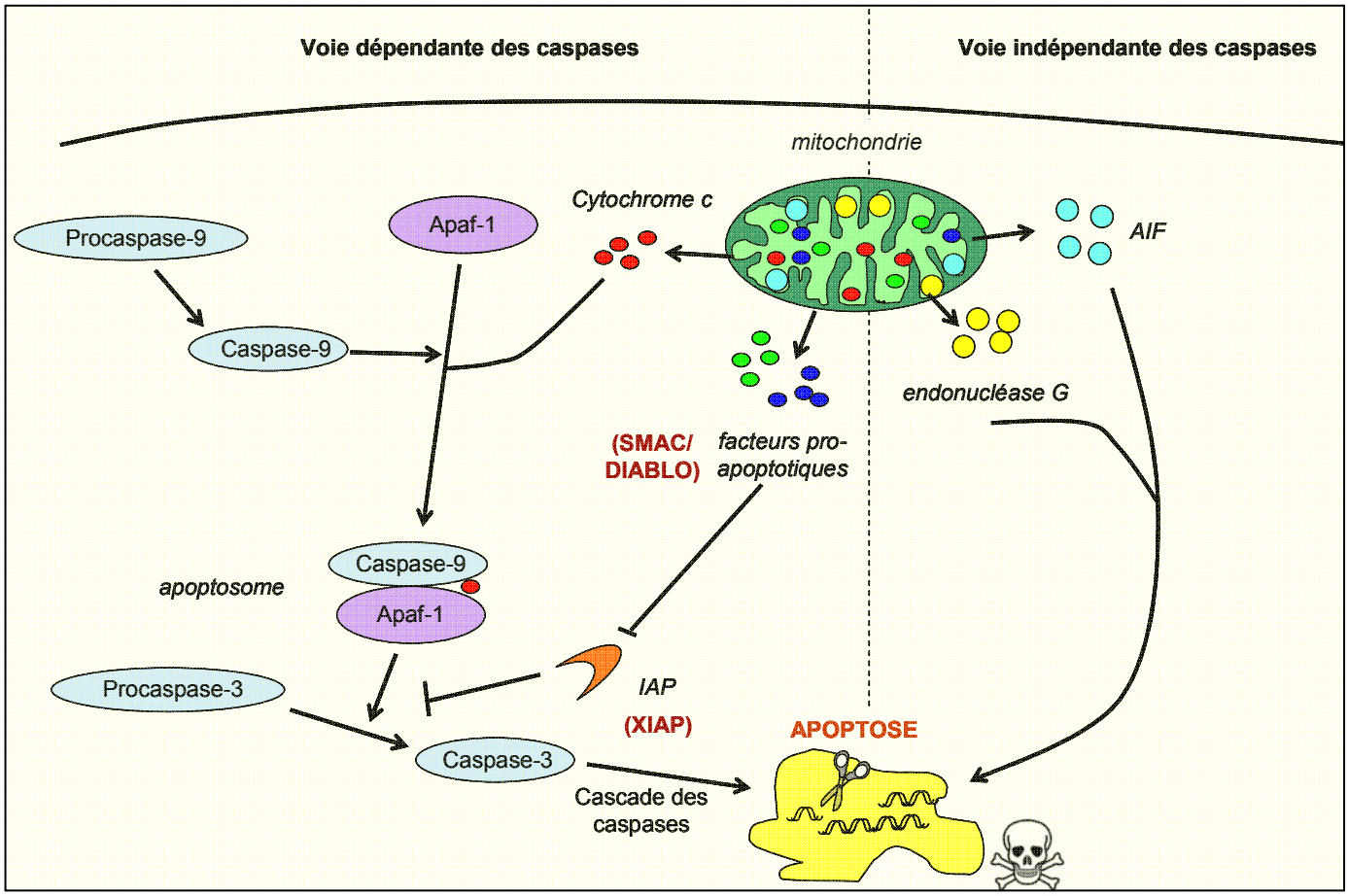


Figure 23 : Voies intrinsèques apoptotiques mitochondriales.

Apaf-1 : Apoptotic peptidase activating factor 1, AIF : Apoptosis Inducing Factor, Smac/DIABLO : (Second mitochondria-derived activator of caspases/Direct IAP-Binding Protein with Low pI, IAP : Inhibitor of Apoptosis Protein, XIAP : X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein

existe à ce jour 14 caspases identifiées chez les mammifères, dont 11 seulement sont retrouvées chez l'homme.

L'apoptose peut être médiée par deux voies : la voie des récepteurs de mort et la voie mitochondriale (Morishima et coll. 2002 ; Zong et coll. 2003 ; Hitomi et coll. 2004). Ces voies sont activées selon la finalité mise en place par la cellule (élimination des cellules en excès, mort cellulaire en réponse à différents stimuli tels que les radiations ionisantes ou des dommages celluaires etc.).

- *La voie des récepteurs de mort* (ou voie extrinsèque)

Cette voie est activée par la fixation de ligands spécifiques sur des récepteurs membranaires dits « récepteurs de mort » appartenant à la superfamille du facteur TNF (*Tumor Necrosis Factor*) (**Figure 22**). Les récepteurs et ligands les mieux caractérisés sont Fas et son ligand FAS-L (Dhein et coll. 1995), TNF-R1 et TNF-R2 et leurs ligands TNF et lymphotoxin (Tartaglia et coll. 1993 ; Ashkenazi & Dixit 1998), TRAMP et son ligand TWEAK (Kitson et coll. 1996 ; Bodmer et coll. 1997 ; Marsters et coll. 1998), TRAIL-R1 (Pan et coll. 1997) et TRAIL-R2 (MacFarlane et coll. 1997) et leur ligand commun TRAIL (Pan et coll. 1997 ; Walczak et coll. 1997).

La fixation du ligand à son récepteur entraine le recrutement d'une protéine adaptatrice située dans le cytosol à la membrane et ceci active la pro-caspase-8 en caspase 8. La caspase-8 activée va alors induire la cascade des caspases dont la caspase-3, caspase effectrice et terminale de cette voie (Hsu et coll. 1995 ; Boatright & Salvesen 2003 ; Alikhani et coll. 2004).

- *La voie mitochondriale* (ou voie intrinsèque)

Dans cette voie, deux grands mécanismes ont été décrits : d'une part l'apoptose mitochondriale dépendante des caspases, d'autres part l'apoptose mitochondriale indépendante des caspases (**Figure 23**). La première étape commune à ces deux voies est la perméabilisation de la membrane mitochondriale en réponse à un stress cellulaire ou des dommages de l'ADN. La mitochondrie rendue perméable va alors relarguer dans le cytoplasme des facteurs pro-apoptogènes (Crompton et coll. 1998 ; Green & Kroemer. 2004) qui peuvent être des pro-caspases inactives (pro-caspase-2, -8 et -9), des protéines chaperonnes (Hsp 60 et Hsp 70), l'endonucléase G ou AIF (*Apoptosis Inducing Factor*)

tel-00719700, version 1 - 20 Jul 2012

(Martinou & Green 2001 ; Tsujimoto 2003), le cytochrome c ou la protéine Smac /DIABLO (*Second mitochondria-derived activator of caspases/Direct IAP-Binding Protein with Low pI*). Ainsi, la mitochondrie est un acteur essentiel dans la régulation de la voie apoptotique mitochondriale. Son intégrité est donc fortement régulée par diverses protéines, les principales appartenant à la famille Bcl-2 (Haldar et coll. 1994 ; Miyashita & Reed 1995 ; Cory & Adams 2002 ; Tsujimoto 2003 ; Chipuk et coll. 2004) : celles-ci peuvent être pro- (Bax, Bak, Bad, Bim, Bid, Puma, Nox) ou anti-apoptotiques (Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-w, Mcl-1, A1) (Chao & Korsmeyer 1998) selon qu'elles préservent l'intégrité de la membrane mitochondriale ou au contraire qu'elles induisent sa perméabilisation. En présence de concentrations élevées en calcium, la transcription du cytochrome c est activée, et celui-ci peut sortir de la mitochondrie et jouer son rôle pro-apoptotique (Freyssenet et coll. 2004).

Dans la voie apoptotique mitochondriale dépendante des caspases, le cytochrome c relargué par la mitochondrie va s'associer dans le cytoplasme avec la protéine Apaf-1 et la caspase-9 en présence d'ATP pour former un complexe dénommé apoptosome (Zou et coll. 1999 ; Jeong & Seol 2008) (**Figure 23**). Il s'agit d'un complexe de haut poids moléculaire (700 kDa) pouvant activer la pro-caspase-3 en caspase-3 (Fan et coll. 2000 ; Jeong & Seol 2008). La caspase-12, activée par un stress du réticulum endoplasmique, peut elle-même activer la pro-caspase-9 en caspase-9 active.

Dans la voie apoptotique mitochondriale indépendante des caspases, les protéines AIF et endonucléase G relarguées par la mitochondrie (Daugas et coll. 2000 ; Li et coll. 2001) vont pouvoir induire d'elles-mêmes la fragmentation de l'ADN et donc l'apoptose cellulaire (van Loo et coll. 2001) (**Figure 23**).

Des voies de régulation internes à ces deux voies ont été décrites : ainsi il existe des protéines anti-apoptotiques, les protéines inhibitrices de l'apoptose (ou IAP, *Inhibitor of Apoptosis Protein*) qui sont des enzymes E3 ligases pouvant ubiquitiner certaines caspases, notamment la caspase-9, et les diriger vers la dégradation par le protéasome (Liston et coll. 2003 ; Yang & Yu 2003). La protéine la plus connue de cette famille, XIAP (*X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein*), est un inhibiteur connu des caspase-3, -9 et -7 (Devereaux & Reed 1999). Ainsi, XIAP est capable d'ubiquitiner les casapases et ainsi de les diriger vers la dégradation par le système ubiquitine-protéasome-dépendant. Certaines protéines sont connues pour jouer une action antagoniste des IAP. Ainsi, la protéine Smac/DIABLO est l'un des substrats connus de l'enzyme XIAP. Son ubiquitination préférentielle permet

tel-00719700, version 1 - 20 Jul 2012

tel-00719700, version 1 - 20 Jul 2012

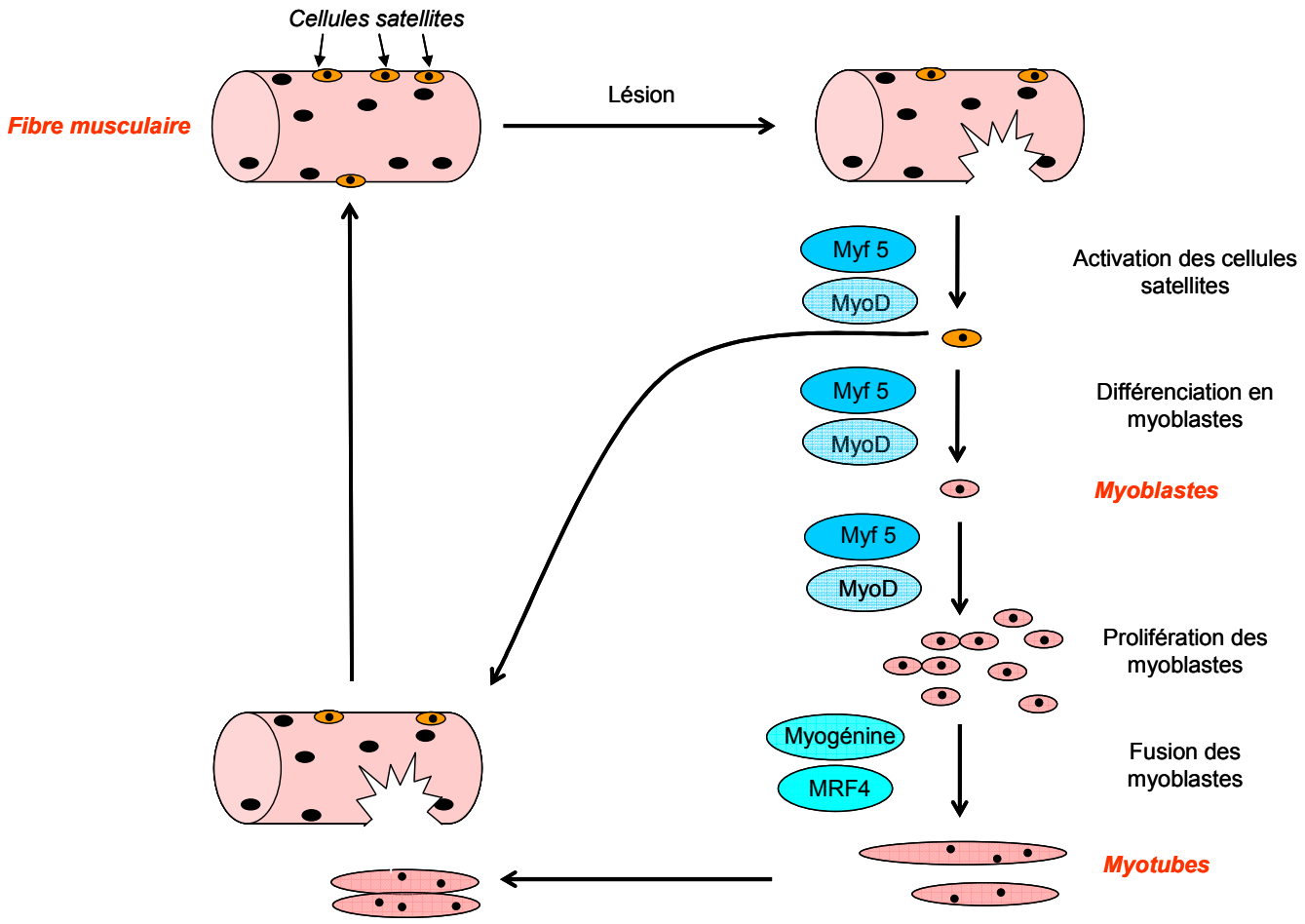


Figure 24 : Mécanismes de la régénération/différenciation musculaire *(d'après Charge & Rudnicki 2004).*
Myf-5 : Myogenic factor 5, MyoD : Myogenic differenciation MRF4 : Muscle Regulatory Factor 4

d'éviter la dégradation des caspases et ainsi de participer à l'activation des caspases et donc à l'induction de l'apoptose (Verhagen et coll. 2000 ; Du et coll. 2000).

2.2. La différenciation/régénération cellulaire

Les processus de régénération/différenciation musculaire, encore appelés myogenèse, sont des mécanismes à part entière dans la croissance, la réparation et la régénération du muscle squelettique adulte (Kadi et coll. 2004). Ces mécanismes permettent notamment le remplacement des cellules musculaires éliminées par apoptose.

La régénération fait intervenir les cellules satellites qui sont des cellules souches mononucléées et quiescentes situées en périphérie des fibres musculaires (**Figure 24**). Le nombre et la distribution de ces cellules satellites au sein des fibres musculaires dépend du type de fibre, de l'âge de l'individu, mais aussi de son niveau d'activité physique (Chen & Goldhamer 2003). La première étape de la différenciation/régénération musculaire au cours de situations d'hypertrophie ou au cours de processus de réparation (Bischoff 1986) passe par l'activation des cellules satellites (Charge & Rudnicki 2004). Les cellules satellites activées vont proliférer (on parle alors de myoblastes) puis ceux-ci vont fusionner entre eux pour donner des myotubes. La différenciation des myoblastes en myocytes donne des fibres musculaires terminales (Langley et coll. 2002). Ceci explique que la cellule musculaire est une cellule plurinucléée. A la fin de ces processus, les noyaux vont d'ailleurs migrer du centre de la fibre vers sa périphérie.

Ces différents phénomènes sont sous la dépendance de facteurs de régulation myogéniques appelés MRF (*Muscle Regulatory Factors*) qui agissent en cascade : Myf-5 (*Myogenic factor 5*), MyoD (*Myogenic differenciation 1*), la myogénine et MRF4 (ou Myf-6, *Myogenic factor 6*). Ces MRF sont des facteurs de transcription pouvant se fixer à l'ADN. Ces 4 facteurs sont exprimés par les cellules satellites activées mais seul Myf-5 est exprimé précocément par les cellules satellites quiescentes, et son expression augmente au cours de l'activation des cellules satellites en myoblastes (Beauchamp et coll. 2000 ; Wozniak et coll. 2005). Gayraud-Morel et coll. ont montré que la présence de Myf-5 était nécessaire pour une régénération efficace (Gayraud-Morel et coll. 2007). Ces différents MRF sont exprimés chacun à une étape bien particulière de la différenciation/régénération musculaire. Les protéines MyoD et Myf-5 seraient exprimées pendant les phases précoces (ils permettraient notamment le « réveil » des cellules satellites quiescentes) alors que les

tel-00719700, version 1 - 20 Jul 2012

protéines myogénine et MRF4 seraient exprimées plus tardivement (en permettant notamment la différenciation terminale des myoblastes en myocytes) (Charge & Rudnicki 2004).

3. Le métabolisme protéique musculaire au cours de deux situations d'atrophie : le vieillissement et l'inactivité physique

Plusieurs modèles d'inactivité physique ont été développés à ce jour. Chez l'homme, les plus utilisés sont l'alitement (*bed rest*), le vol spacial, la suspension unilatérale d'une jambe et l'immobilisation d'une articulation (Adams et coll. 2003). Chez l'animal les modèles les plus fréquents sont la suspension du train arrière (Jaspers & Tischler 1984 ; Morey-Holton & Globus 2002), l'immobilisation d'une articulation (Booth & Seider 1979a) ou la dénervation (Goldspink 1976).

Au cours de la sarcopénie, le métabolisme protéique musculaire est déséquilibré en faveur d'une perte des protéines musculaires. Ce même déséquilibre du taux de renouvellement protéique existe en situation d'atrophie induite par l'inactivité physique/l'immobilisation, et conduit à la génération de l'atrophie. Il est donc indispensable de connaître l'évolution du taux de renouvellement protéique d'une part au cours du vieillissement et d'autre part au cours de l'inactivité physique, mais aussi l'interaction qui peut exister entre ces deux situations puisqu'ensemble, elles peuvent majorer la perte de muscle et ainsi fragiliser davantage la personne âgée.

3.1. La dégradation protéique

- *Au cours du vieillissement*

Les différentes voies protéolytiques ont été largement étudiées et mises en cause dans la mise en place de la sarcopénie. Ainsi, plusieurs études ont mis en évidence une augmentation de l'activité globale de la voie calcium-dépendante et une diminution des niveaux protéiques de la calpastatine, l'inhibiteur endogène des calpaïnes (Dargelos et coll. 2007). L'activité de la voie lysosomale semble être elle aussi augmentée avec une accumulation de cathepsine D visible dans les muscles de rats âgés (Wiederanders & Oelke 1984 ; Terman & Brunk 2004) et une augmentation de l'expression de la cathepsine L (Pattison et coll. 2003b), qui est un marqueur de la perte musculaire (Attaix & Béchet

tel-00719700, version 1 - 20 Jul 2012

tel-00719700, version 1 - 20 Jul 2012

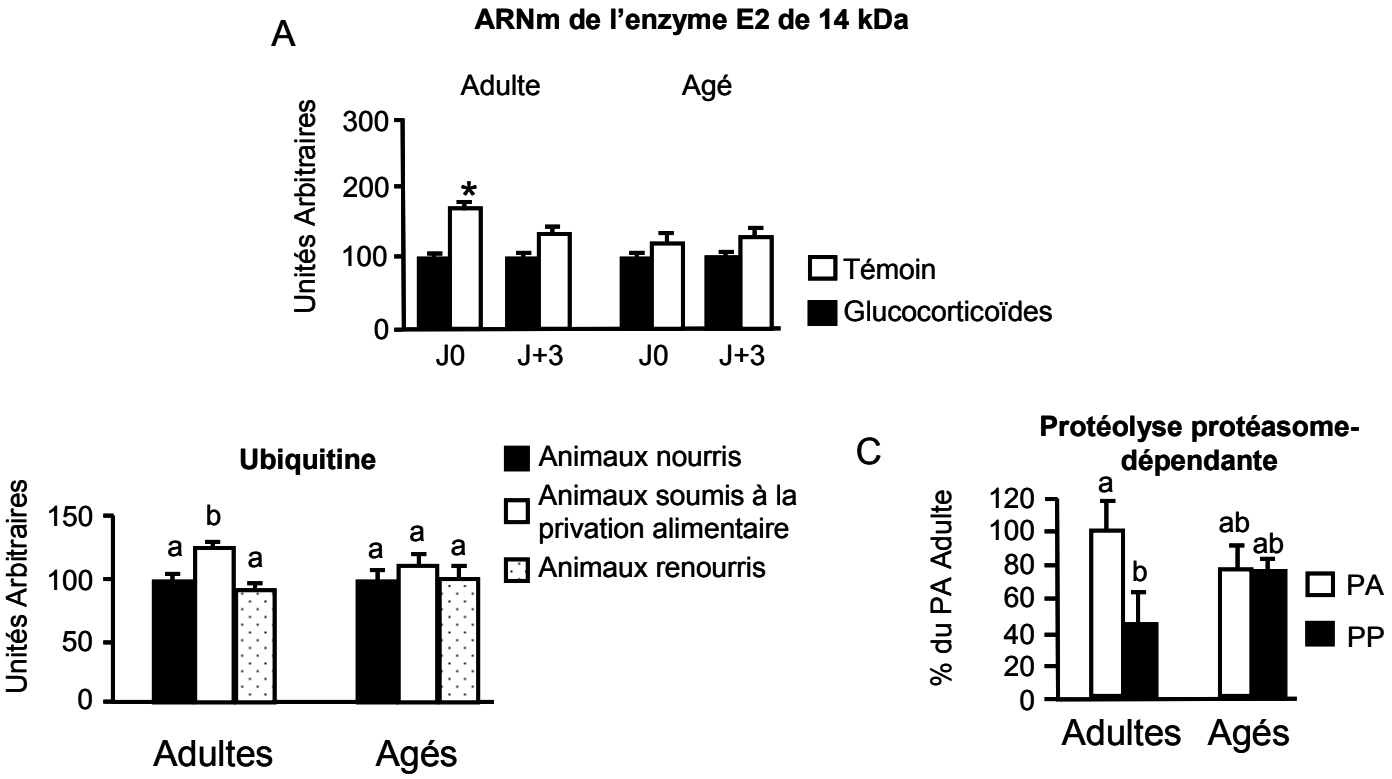


Figure 25 : Défaut de réponse de la voie ubiquitine-protéasome-dépendante au cours du vieillissement en réponse à des stimuli cataboliques et anaboliques : effet d'un traitement aux glucocorticoïdes *(A)* et effet de la prise alimentaire *(B et C)* *(d'après Dardevet et coll. 1995 ; Mosoni et coll. 1999 ; Combaret et coll. 2005).*

J0 : traitement aux glucocorticoïdes, J+3 : 3ème jour de récupération post-traitement, PA : Postabsorptif, PP : Postprandial

2007).

Concernant la voie ubiquitine-protéasome-dépendante, la plupart des études ont été réalisées à l'état basal (i.e postabsorptif) et ne permettent pas de déceler des anomalies de la réponse de la protéolyse musculaire aux stimuli extérieurs. Ainsi, chez l'animal, une absence de réponse de cette voie protéolytique suite à un traitement aux glucocorticoïdes (Dardevet et coll. 1995) ou en réponse à la prise d'un repas (Mosoni et coll. 1999 ; Combaret et coll. 2005) (**Figure 25**) a été observée chez le rat âgé. Enfin, un certain nombre d'études confirment que la protéolyse ne serait pas affectée à l'état postabsorptif au cours du vieillissement (Volpi et coll. 2001 ; Wilkes et coll. 2009), mais le serait à l'état postprandial (Arnal et coll. 2002). Ainsi, un défaut d'inhibition de la protéolyse ubiquitine-protéasome-dépendante en réponse à la prise d'acides aminés a pu être mis en évidence chez le rat âgé (Capel et coll. 2009). Seules des mesures indirectes ont permis l'étude de cette voie protéolytique au cours du vieillissement chez les rongeurs ou l'homme *in vivo*, telles que la mesure de la quantité de protéasomes dans un tissu, la mise en évidence de protéines polyubiquitinées ou la mesure d'activités protéolytiques (Pattison et coll. 2003b ; Welle et coll. 2003 ; Cai et coll. 2004a ; Husom et coll. 2004 ; Combaret et coll. 2005 ; Deruisseau et coll. 2005 ; Clavel et coll. 2006). Une étude récente semble démontrer une augmentation de la quantité de protéasomes 26S dans les muscles de rats âgés de 30 mois comparativement à des rats âgés de 4 mois (Altun et coll. 2010) et les niveaux d'ARNm codant pour l'ubiquitine seraient augmentés dans les muscles de rats âgés de 24 mois (Cai et coll. 2004a). Malgré ces études semblant démontrer une augmentation de cette voie au cours du vieillissement, d'autres études contradictoires montrent que cette voie métabolique semble régulée de façon assez variable au cours du vieillissement. En effet, si plusieurs études ont rapporté une augmentation de l'activité du protéasome ou de l'expression de ses composantes (Clavel et coll. 2006), d'autres ont pu montrer une diminution de l'activité du système ubiquitine-protéasome-dépendant (Ferrington et coll. 2005) ou de ses activités peptidasiques (Husom et coll. 2004 ; Combaret et coll. 2005) au cours de l'avancée en âge. Certains auteurs rapportent une diminution des taux d'ARNm des enzymes E2 (Deruisseau et coll. 2005) et de l'enzyme E3 ligase MuRF1 dans les muscles *soleus* de rats âgés alors que d'autres montrent que l'expression des enzymes MuRF1 et MAFbx/Atrogin-1 serait augmentée avec l'âge (Pattison et coll. 2003b ; Welle et coll. 2003 ; Clavel et coll. 2006) mais dans des proportions inférieures par rapport à d'autres modèles d'atrophie musculaire (1,5 à 2,5 contre 10 fois). Enfin, d'autres études

tel-00719700, version 1 - 20 Jul 2012

n'ont pas mis en évidence d'augmentation des niveaux d'ARN m de ces deux enzymes (Edstrom et coll. 2006).

Ces observations suggèrent une diminution de la protéolyse ubiquitine-protéasome-dépendante au cours du vieillissement, même si certaines études ne démasquent pas d'altération de cette voie (Radak et coll. 2002).

En conclusion, il apparait que les voies protéolytiques semblent relativement dérégulées au cours du vieillissement. Si aucune étude n'a pu montrer formellement une augmentation de la protéolyse totale, il semble cependant que la voie ubiquitine-protéasome dépendante deviendrait moins sensible aux signaux anaboliques ou cataboliques.

- ***Au cours de l'inactivité physique chez l'adulte***

Le déséquilibre du taux de renouvellement protéique qui apparaît au cours de l'inactivité physique peut être en partie expliqué par une augmentation de l'activité des différentes voies protéolytiques, ceci expliquant la perte des protéines musculaires. Ainsi, la protéolyse est augmentée en cas d'inactivité (+50 à +200% selon le modèle d'atrophie utilisé et le muscle étudié) (Jaspers & Tischler 1984 ; Loughna et coll. 1986 ; Munoz et coll. 1993 ; Zdanowicz & Teichberg 2003) et cette augmentation atteint un pic après 14-15 jours chez l'animal (Thomason et coll. 1989) avant de revenir à son niveau inital au bout de 24 jours chez l'animal (Mihara & Uchiyama 1978).

La voie du protéasome est activée chez l'homme et l'animal lors d'une diminution d'activité physique ou d'inactivité totale (Reid 2005). Ceci n'est pas surprenant dans la mesure où 1/ l'inactivité musculaire est associée à une perte des protéines myofibrillaires et 2/ cette voie protéolytique est impliquée dans la dégradation des protéines contractiles majeures (actine et myosine). L'expression des composantes du protéasome 26S est augmentée au cours de la dénervation (Sacheck et coll. 2007), de l'apesanteur (Taillandier et coll. 1996 ; Ikemoto et coll. 2001 ; Stevenson 2003 ; Dupont-Versteegden et coll. 2006) ou de l'immobilisation (Jones et coll. 2004). Les 3 principales activités protéolytiques du protéasome sont soit augmentées avec l'apesanteur (Ikemoto et coll. 2001 ; Yimlamai et coll. 2005) ou l'immobilisation par plâtrage (Vazeille et coll. 2008), soit inchangées (Ikemoto et coll. 2001 ; Dupont-Versteegden et coll. 2006). La première étape de ce système, l'ubiquitination des protéines cibles (notamment l'ubiquitination des chaînes lourdes de myosine), semble être augmentée chez l'animal au cours de l'inactivité

tel-00719700, version 1 - 20 Jul 2012

tel-00719700, version 1 - 20 Jul 2012

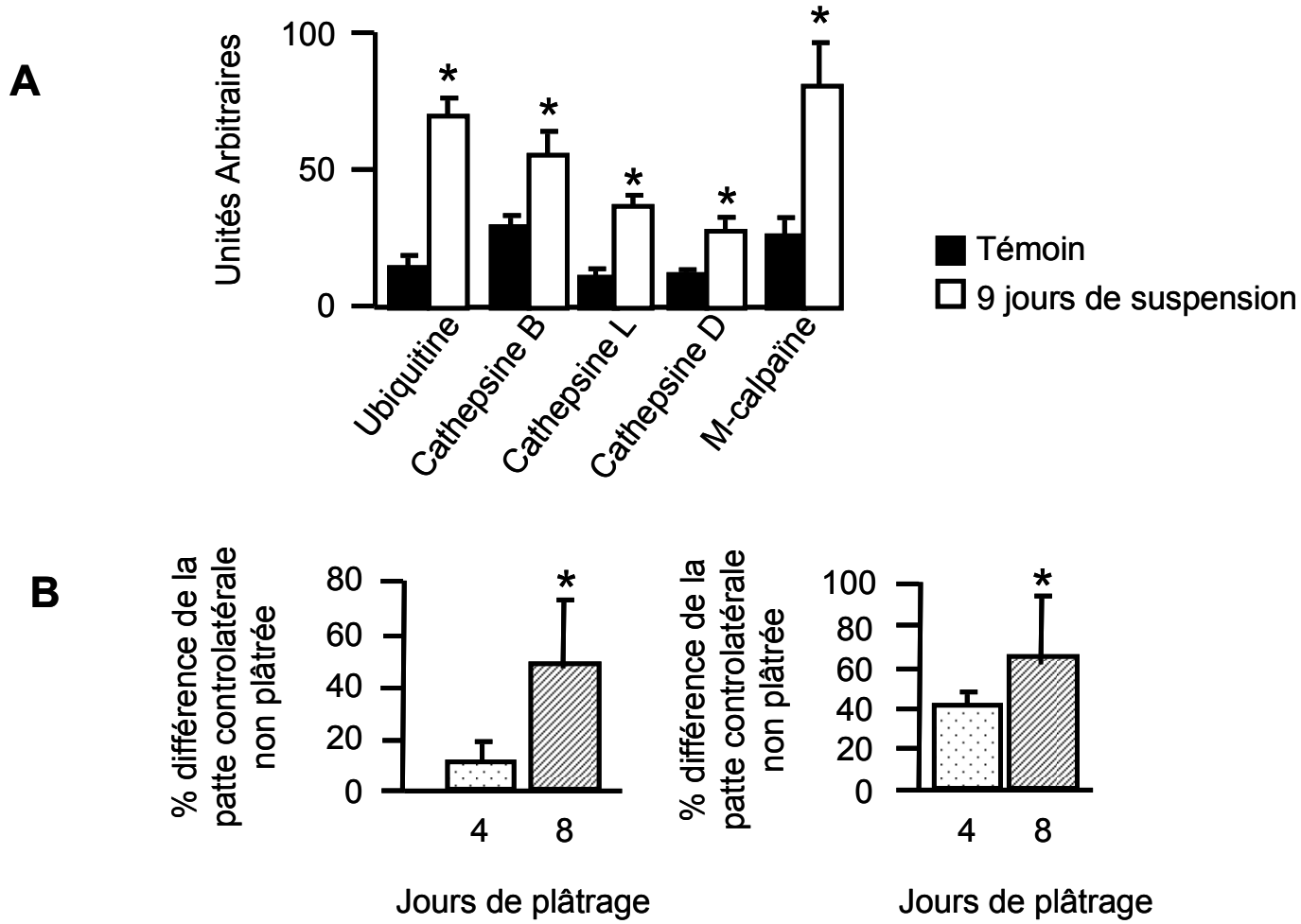


Figure 26 : Effet de l'inactivité physique obtenu sur différentes composantes des voies protéolytiques par un modèle de suspension *(A)* et par un modèle de plâtrage *(B)* chez le rat *(d'après Taillandier et coll. 1996 ; Vazeille et coll. 2008).*

musculaire (Medina et coll. 1995) mais aussi après des périodes d'apesanteur (Taillandier et coll. 1996-2003 ; Ikemoto et coll. 2001 ; Yimlamai et coll. 2005 ; Dupont-Versteegden et coll. 2006 ; Judge et coll. 2007) ou une immobilisation par plâtrage (Vazeille et coll. 2008) (**Figure 26**). Cette augmentation de conjugués polyubiquitinés est retrouvée chez l'homme après deux jours d'immobilisation (Glover et coll. 2010). Ces observations associées à une augmentation de la vitesse d'ubiquitination des protéines en cas d'atrophie musculaire (Combaret et coll. 2004) confirment l'activation de cette étape clé de la protéolyse. Les étapes suivantes semblent être régulées différemment suivant les modèles d'immobilisation. Si une étude récente a montré que les enzymes MuRF1 et MAFbx/Atrogin-1 sont régulées dès les première 48h d'immobilisation (Abadi et coll. 2009), les ARNm de l'enzyme E3 ligase MAFbx/Atrogin-1 sont augmentés après 14 jours d'immobilisation chez l'homme (Jones et coll. 2004) ou dans les atrophies induites par dénervation chez l'animal (Bodine et coll. 2001). Les enzymes E3 ligases, dont MAFbx/Atrogin-1 et MuRF1, seraient ainsi augmentées dans différents modèles d'inactivité physique (Favier et coll. 2007). Les concentrations intra-cellulaires en calcium sont élevées au cours de la « décharge musculaire », ceci permettant certainement de stimuler l'activité des calpaïnes (Goll et coll. 2003). Ainsi, l'expression des ARNm des calpaïnes ubiquitaires et des m- ou μ-calpaïnes ainsi que de leurs différents régulateurs est augmentée en cas d'atrophies induites par l'apesanteur simulée (Taillandier et coll. 1996 ; Stevenson et coll. 2003 ; Goll et coll. 2003) (**Figure 26**). Cette observation est confirmée par une augmentation de l'activité de ces calpaïnes *in vivo* et *in vitro* en réponse à l'inactivité physique (Baker & Margolis 1987 ; Tischler et coll. 1990 ; Taillandier et coll. 1996). En ce qui concerne la protéolyse lysosomale, les taux d'ARNm et l'activité de la cathepsine L, qui est un marqueur de l'atrophie musculaire, et de la cathepsine B, sont augmentés en cas d'apesanteur simulée (Taillandier et coll. 1996) (**Figure 26**). Ces observations sont confirmées par une augmentation de cette voie protéolytique au cours de la suspension (Andrianjafiniony et coll, 2010) et de la dénervation (Zhao & Brault 2007 ; O'Leary & Hood 2009). L'autophagie contribuerait donc à l'atrophie dans ces situations d'inactivité physique. Ceci ne semble pas surprenant puisqu'elle serait sous le contrôle du même facteur de transcription que la voie ubiquitine-protéasome-dépendante (FoxO3) (Attaix & Béchet 2007).

En conclusion, les voies protéolytiques semblent toutes activées au cours de l'inactivité physique, participant ainsi à la dégradation des protéines musculaires, et ce quel que soit

tel-00719700, version 1 - 20 Jul 2012

le modèle d'inactivité physique utilisé.

- *Au cours du vieillissement et de l'inactivité physique*

Il existe peu d'études à ce jour ayant démontré l'impact du vieillissement et de l'inactivité physique sur la protéolyse musculaire. Par une étude d'expression génique, Pattisson et coll. ont pu mettre en évidence que, chez des rats âgés immobilisés pendant 10 jours, de nombreux gènes codant pour des composantes des différentes voies protéolytiques (comme certaines sous-unités du protéasome, l'ubiquitine, la cathepsine L, la calpaïne 3, etc.) étaient largement régulés de façon positive en réponse à l'immobilisation par rapport à des animaux adultes immobilisés (Pattisson et coll. 2003-2003b).

3.2. La synthèse protéique

- *Au cours du vieillissement*

Au cours du vieillissement, la mesure de la synthèse protéique musculaire à l'état basal (i.e. postabsorptif) n'est pas altérée chez l'homme (Volpi et coll. 2001) alors que les données obtenues chez l'animal sont contradictoires. Ainsi, la synthèse protéique est diminuée dans les muscles *gastrocnemius* de rats âgés (Kelly et coll. 1984 ; Fruhbeck et coll. 1996), ou inchangée voire augmentée (Mays et coll. 1991 ; Mosoni et coll. 1993 ; Dardevet et coll. 1994-2002). Ces données contradictoires peuvent être expliquées par le fait que la diminution de synthèse des protéines musculaires n'affecte pas toutes les protéines de façon équivalente : les protéines sarcoplasmiques sont relativement préservées (Balagopal et coll. 1997) alors que les protéines myofibrillaires (Welle et coll. 1993 ; Nair 1995) et mitochondriales (Rooyackers et coll. 1996) sont les plus touchées. La diminution de synthèse des protéines myofibrillaires est ainsi de 44% chez des sujets âgés comparativement à des sujets adultes (Welle et coll. 1993). La diminution de la synthèse protéique au cours du vieillissement s'explique en partie par une altération des voies de signalisation de la synthèse protéique : ainsi, les niveaux de phosphorylation (et donc d'activation) de la kinase Akt, initiatrice de la cascade menant à la synthèse des protéines, sont diminués dans le muscle *tibialis anterior* (Clavel et coll. 2006) ou le muscle

tel-00719700, version 1 - 20 Jul 2012

tel-00719700, version 1 - 20 Jul 2012

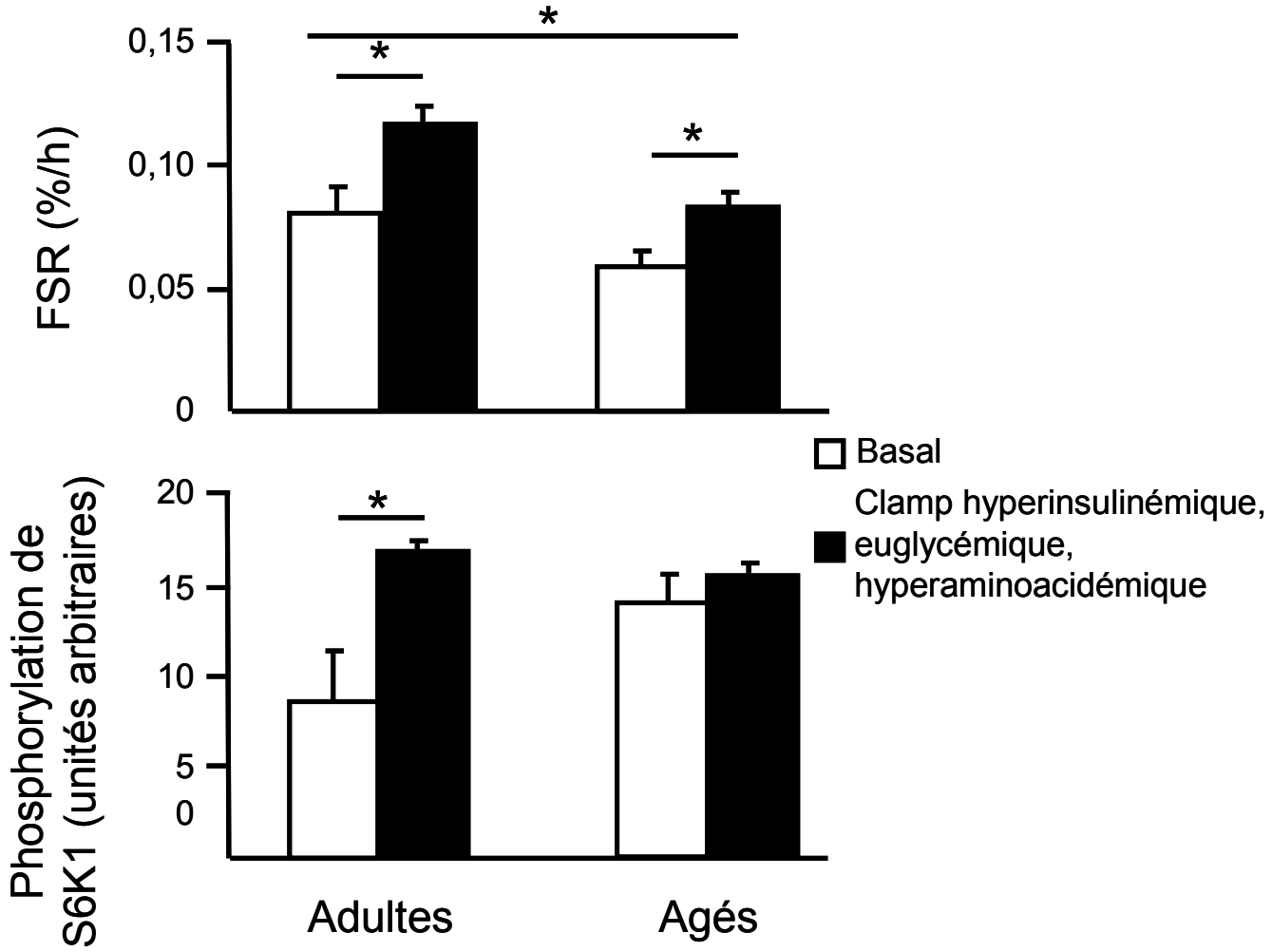


Figure 27 : Altération de la réponse de la synthèse protéique chez l'homme en réponse à des signaux anaboliques *(d'après Guillet et coll. 2004a).*
Le taux de synthèse protéique fractionnaire (FSR) musculaire est inférieur chez des sujets âgés (0,061±0,004%/h) comparativement à des sujets adultes (0,082±0,010%/h, âgés vs adultes, $P<0.05$). Ce résultat peut être en partie expliqué par une perte de la stimulation de la phosphorylation de la protéine S6K1 en réponse aux acides aminés.
FSR : fractional synthetic rate (taux de synthèse fractionnaire des protéines)

gastrocnemius (Haddad & Adams 2006), ce qui va dans le sens d'une baisse de la synthèse protéique musculaire.

Au cours du vieillissement la stimulation de la synthèse protéique musculaire est fortement réduite en réponse à des signaux anaboliques (Mosoni et coll. 1995 ; Dardevet et coll. 2003 ; Guillet et coll. 2004a ; Cuthbertson et coll. 2005 ; Fujita et coll. 2009) (**Figure 27**). Ceci s'explique par une perte de sensibilité du muscle à l'effet de l'insuline et/ou des acides aminés. Cette perte de sensibilité corrèle avec une diminution de la phosphorylation de S6K1 en réponse à des signaux anaboliques comme le repas (Dardevet et coll. 2000 ; Guillet et coll. 2004a) (**Figure 27**). L'origine de ces perturbations pourrait s'expliquer par la présence d'un stress oxydant ou d'une inflammation perturbant les voies de signalisation de la synthèse protéique (Visser et coll. 2002 ; Schaap et coll. 2006 ; Marzani et coll. 2008 ; Rieu et coll. 2009 ; Balage et coll. 2009). Ces observations semblent confirmées par des études ayant mis en évidence une association entre des marqueurs pro-inflammatoires liés au vieillissement et une diminution de la synthèse protéique chez l'homme (Toth et coll. 2005) ou une diminution de la stimulation postprandiale de la synthèse protéique chez le rat (Balage et coll. 2009).

Les données concernant la synthèse des protéines musculaires à l'état postabsorptif sont contradictoires. Cependant, à l'état postprandial la synthèse protéique musculaire est diminuée.

➢ *Au cours de l'inactivité physique chez l'adulte*

Chez le rat, la perte de masse musculaire observée au cours de l'inactivité musculaire est due à une diminution de la protéosynthèse au cours de la première semaine d'inactivité (Thomason et coll. 1989). Plus précisément, la synthèse protéique est réduite dans le muscle squelettique après 6h d'immobilisation par plâtrage (Booth & Seider 1979b) ou suspension (Goldspink et coll. 1986 ; Thomason & Booth 1990) et ceci pendant toute la période d'immobilisation (Goldspink 1977a-1977b), pouvant atteindre -50 à -70% après 7-14 jours (Booth & Criswell 1997 ; de Boer et coll 2007). Des études d'alitement chez l'homme, confirment que la synthèse protéique au niveau corps entier et au niveau musculaire est diminuée chez des adultes après 14 jours d'alitement (Ferrando et coll. 1996 ; Smith et coll. 2000). Cependant ces altérations de la synthèse protéique musculaire ne seraient pas équivalentes selon que l'on considère l'état postprandial et l'état postabsorptif. A l'état postabsorptif la synthèse protéique est soit modérément diminuée

tel-00719700, version 1 - 20 Jul 2012

tel-00719700, version 1 - 20 Jul 2012

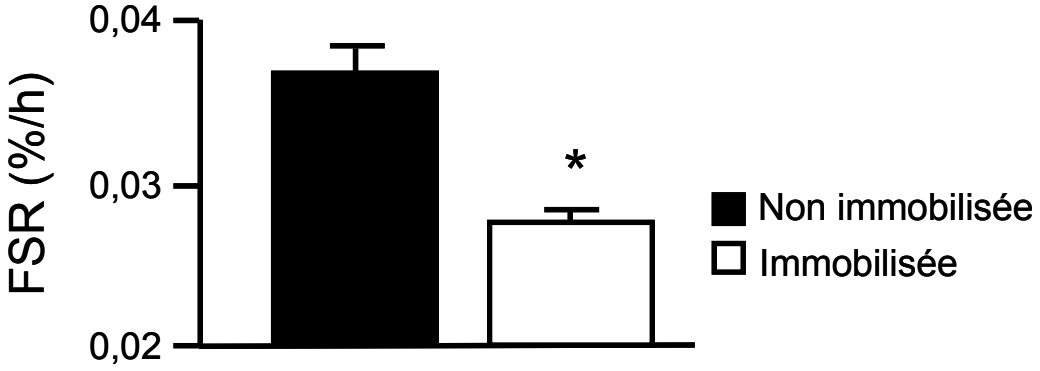


Figure 28 : Altération de la synthèse protéique à l'état postprandial par l'immobilisation chez l'homme adulte *(d'après Glover et coll. 2008).*
FSR : fractional synthetic rate (taux de synthèse fractionnaire des protéines)

(Gibson et coll. 1987 ; Biolo et coll. 2004), soit inchangée après une courte période d'alitement (Shangraw et coll. 1988 ; Stuart et coll. 1990 ; Lovejoy et coll. 1999 ; Stein et coll. 1999). En revanche, à l'état nourri, elle est fortement diminuée au cours de l'inactivité physique (Ferrando et coll. 1996 ; Paddon-Jones et coll. 2006 ; de Boer et coll. 2007 ; Glover et coll. 2008) (**Figure 28**). Ainsi, Glover et coll. postulent même qu'il y aurait une véritable résistance anabolique de la protéosynthèse à l'effet stimulateur des acides aminés au cours de l'immobilisation (Glover et coll. 2008). Cette diminution survient très tôt au cours de l'immobilisation (10 jours) puis la protéosynthèse reste stable par la suite (de Boer et coll. 2007).

Au niveau des voies de signalisation, le contenu en protéine kinase Akt serait diminué (Bodine et coll. 2001) et son activité serait soit diminuée au cours de la suspension (O'Keefe et coll. 2004 ; Sugiura et coll. 2005) soit inchangée (Hunter et coll. 2002 ; Morris et coll. 2004). Les niveaux de phosphorylation de eEF2 et S6K1 sont augmentés et diminués respectivement après la dénervation et la suspension (Hornberger et coll. 2001), ceci traduisant une dimition de la synthèse protéique. De plus, la perte de masse musculaire au cours de la suspension a pu être corrélée avec une augmentation de la formation du complexe 4E-BP1/eIF4E (Bodine et coll. 2001). Ces observations semblent confirmer une diminution de la synthèse protéique au cours de l'inactivité physique. Cependant, 10 ou 21 jours d'immobilisation n'ont pas d'effet sur l'état de phosphorylation de S6K1 et 4E-BP1 chez l'homme (de Boer et coll. 2007) ou l'animal (Bodine et coll. 2001 ; Hornberger et coll. 2001 ; Reynolds et coll. 2002 ; Vargas & Lang 2008 ; Gwag et coll. 2009).

En conclusion, l'inactivité physique induit une diminution précoce de la protéosynthèse au niveau corps entier et musculaire. Si les données enregistrées en période post-absorptive restent contradictoires, il semble cependant que la protéosynthèse est réduite à l'état postprandial.

➢ *Au cours du vieillissement et de l'inactivité physique*

Chez l'homme, une diminution de la synthèse protéique a été mise en évidence après 10 jours d'alitement et ceci était associé à une diminution de la balance azotée (Kortebein et coll. 2007 ; Ferrando et coll. 2010).

tel-00719700, version 1 - 20 Jul 2012

tel-00719700, version 1 - 20 Jul 2012

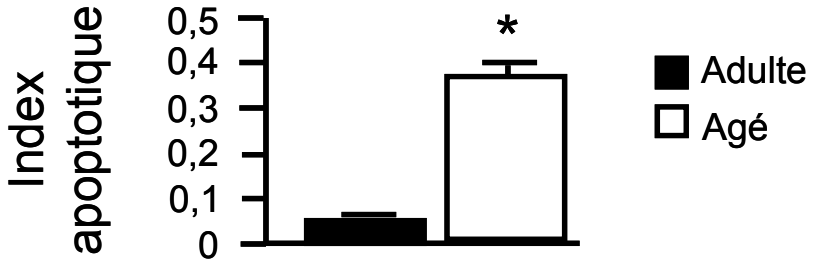


Figure 29 : Apoptose dans les muscles *plantaris* mesurée chez des rats adultes et des rats âgés *(d'après Pistilli et coll. 2006a).*

tel-00719700, version 1 - 20 Jul 2012

4. Le métabolisme cellulaire au cours du vieillissement et de l'inactivité physique

4.1. L'apoptose ou mort cellulaire programmée

➢ *Au cours du vieillissement*

L'apoptose est plus élevée avec l'avancée en âge dans les muscles squelettiques (McArdle et coll. 2002 ; Welle 2002 ; Greenlund & Nair 2003) et en particulier au niveau des membres inférieurs (Dirks & Leeuwenburgh 2002 ; Pistilli et coll. 2006a ; Marzetti et coll. 2008b; Braga et coll. 2008) (**Figure 29**). Ces observations ont pu être confirmées par une augmentation de la fragmentation de l'ADN et du nombre de noyaux apoptotiques (Dirks & Leeuwenburgh 2002 ; Whitman et coll. 2005 ; Leeuwenburgh et coll. 2005 ; Rice & Blough 2006). Ainsi, l'avancée en âge est associée à une augmentation de l'apoptose des noyaux dans les fibres musculaires (Strasser et coll. 2000 ; Malmgren et coll. 2001 ; Whitman et coll. 2005) et ceci peut être corrélé à une perte de masse et de fonction musculaire (Baker & Hepple 2006 ; Marzetti et coll. 2008b). Cette perte de noyaux semble importante mais il faut garder à l'esprit que les cellules musculaires sont plurinuclées donc que lorsque des noyaux sont éliminés par apoptose, les autres noyaux sont là pour prendre le relais. Cependant, une perte massive de noyaux peut induire une perte de fonctionnalité de ces cellules musculaires et ainsi participer à la perte de fonctionnalité musculaire observée au cours de la sarcopénie (Marzetti & Leeuwenburgh 2006). Ceci pourrait passer par une diminution des domaines myonucléaires.

L'apoptose cellulaire peut être médiée par deux voies, la voie des récépteurs de mort et la voie mitochondriale (*voir § 2.1*), et celles-ci ont toutes les deux été étudiées au cours du vieillissement. La voie des récepteurs de mort de l'apoptose, médiée notamment par la cytokine pro-inflammatoire TNF-α, est augmentée chez les rongeurs (Phillips & Leeuwenburgh 2005 ; Pistilli et coll. 2006b ; Marzetti et coll. 2008a ; Marzetti et coll. 2009 ; Andrianjafiniony et coll. 2010). On pourrait donc penser qu'il y aurait un lien entre l'augmentation de l'inflammation liée à l'âge et l'augmentation de l'apoptose des cellules par la voie des récepteurs de mort.

Concernant la voie apoptotique mitochondriale dépendante des caspases, elle semble régulée de façon beaucoup moins constante au cours du vieillissement. Ainsi, les niveaux protéiques ou les activités d'Apaf-1 et de la caspase-9 (impliqués dans la formation de

tel-00719700, version 1 - 20 Jul 2012

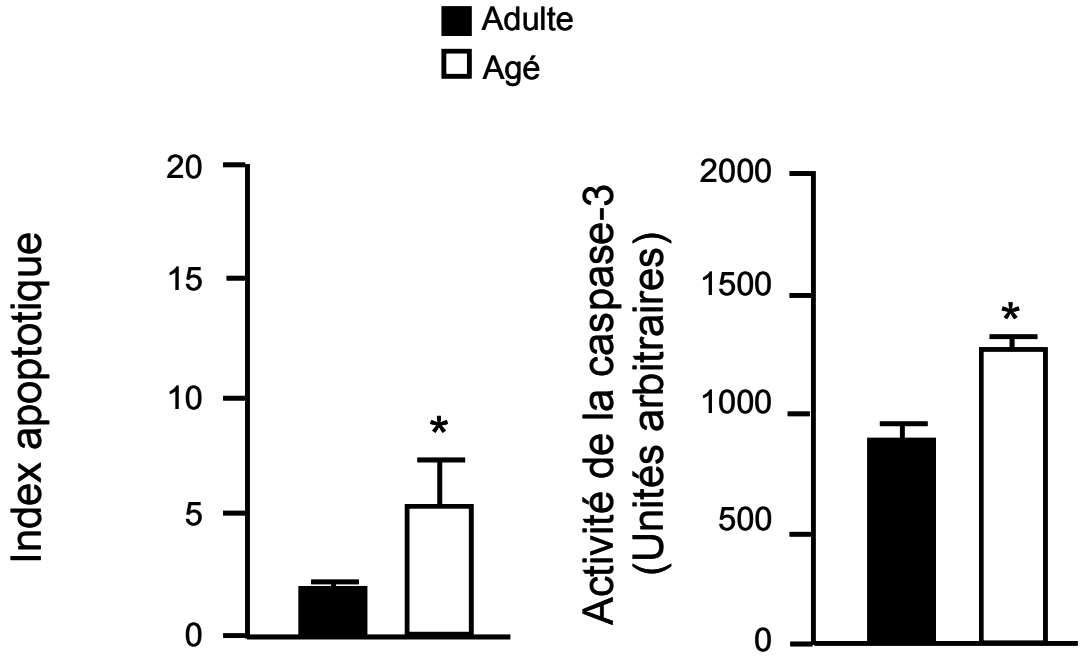


Figure 30 : Apoptose mesurée dans les muscles *soleus* chez des rats adultes et des rats âgés immobilisés par suspension *(d'après Leeuwenburgh et coll. 2005).*

l'apoptosome) et de la caspase-3 (caspase effectrice de cette voie) sont soit augmentés soit inchangés avec l'âge dans les muscles squelettiques (Dirks & Leeuwenburgh 2002-2004 ; Siu et coll. 2005 ; Whitman et coll. 2005 ; Chung & Ng 2006). Les niveaux protéiques du cytochrome c (lui aussi impliqué dans la formation de l'apoptosome) seraient eux aussi soit diminués (Dirks & Leeuwenburgh 2002) soit augmentés (Siu et coll. 2005). De la même façon, le facteur protéique pro-apoptotique AIF, relargué par la mitochondie, peut être soit augmenté (Dirks & Leeuwenburgh 2004), soit diminué (Chung & Ng 2006). Les niveaux protéiques de XIAP (protéine anti-apoptotique régulant cette voie), sont augmentés avec l'âge dans les muscles *gastrocnemius* (Siu et coll. 2005) suggérant un mécanisme d'adaptation pour contrer l'augmentation de la caspase-3. D'autres auteurs suggèrent que cette voie mitochondriale serait augmentée au cours du vieillissement (Andrianjafiniony et coll. 2010). Ces études contradictoires démontrent que cette voie de l'apoptose est différemment régulée au cours du vieillissement selon les modèles d'études utilisés (animal, âge, muscle etc.). Pour Marzetti et coll, l'augmentation de l'apoptose liée à l'âge passerait par la voie indépendante des caspases (Marzetti et coll. 2008b).

En conclusion, le vieillissement est associé à une augmentation du nombre de noyaux apoptotiques et/ou des actvités ou expression des caspases. Ceci laisse supposer que l'apoptose serait augmentée au cours du vieillissement. Si la voie des récepteurs de mort semble systématiquement activée, l'activation de la voie mitochondriale dépendante des caspases semble cependant beaucoup plus variable selon les études.

➢ *Au cours de l'inactivité physique chez l'adulte*

L'inactivité physique induit une perte de cellules musculaires fonctionnelles par apoptose mais aussi une perte des noyaux dans les fibres musculaires chez l'animal, que ce soit avec un modèle de suspension (Allen et coll. 1997a ; Leeuwenburgh et coll. 2005), de dénervation (Schmalbruch & Lewis 2000) ou d'immobilisation (Smith et coll. 2000). Cette augmentation de l'apoptose serait surtout détectable dans les fibres lentes (Allen 1996-1997b ; Leeuwenburgh et coll. 2005) (**Figure 30**). Une augmentation de la fragmentation de l'ADN est observée au cours de l'inactivité physique que ce soit avec un modèle de suspension (Vandenburgh et coll. 1989 ; Allen et coll. 1997b), de dénervation chez le rat (Vandenburgh et coll. 1990) ou de plâtrage chez le lapin (Smith et coll. 2000) ou le rat (Vazeille et coll. 2008). Ces résultats sont confirmés par une augmentation importante du

tel-00719700, version 1 - 20 Jul 2012

nombre de noyaux apoptotiques dans les cellules des muscles atrophiés chez le lapin ou le rat (Smith et coll. 2000 ; Oishi et coll. 2008). Cette augmentation du nombre de noyaux pourrait résulter en une diminution du nombre de noyaux dans les fibres musculaires. Ceci associé à une diminution de la surface des fibres pourrait expliquer la diminution des domaines myonucléaires observée (Favier et coll. 2007).

Les deux voies de l'apoptose seraient activées au cours des atrophies induites par l'inactivité physique chez des animaux adultes. Cependant, la voie des récepteurs de mort et l'implication de la caspase-8 ont été relativement peu étudiées même si cette voie semble activée au cours de l'inactivité induite par apesanteur (Ferreira et coll. 2008 ; Marzetti et coll. 2008b). La voie apoptotique mitochondriale dépendante des caspases a été bien caractérisée au cours des processus d'atrophie musculaire induite par l'inactivité physique et elle semble fortement activée. Ainsi, une augmentation des niveaux de fragmentation de l'ADN, de l'expression de gènes pro-apoptotiques de la protéine pro-apoptotique Bax ou des caspases-3, -6, -9 ou -12 a été enregistrée après une période d'immobilisation (Leeuwenburgh et coll. 2005 ; Berthon et coll. 2007 ; Servais et coll. 2007). Une augmentation du contenu en cytochrome c, d'Apaf-1 (Siu & Alway 2006 ; Adihetty et coll. 2007 ; Vazeille et coll. 2008) et de la l'activité de la caspase-9 (Vazeille et coll. 2008) (tous trois impliqués dans la formation de l'apoptosome) a été observée au cours de l'immobilisation. L'activité de la caspase-3, qui est la caspase effectrice de l'apoptose, est largement augmentée au cours d'une atrophie musculaire induite par apesanteur chez le rat (Ferreira et coll. 2008 ; Berthon et coll. 2007), par dénervation (Siu & Alway 2006) ou par plâtrage (Vazeille et coll. 2008). Concernant les régulateurs de cette voie, les données semblent contradictoires. Ainsi, les niveaux protéiques de la protéine pro-apoptotique Smac/DIABLO et de la protéine anti-apoptotique XIAP semblent augmentés et diminués respectivement (Siu & Alway 2006 ; Vazeille et coll. 2008) ou inchangés (Siu et coll. 2005) selon le modèle utilisé.

En conclusion, l'inactivité physique est associée à une augmentation du nombre de noyaux apoptotiques et/ou des actvités ou expression des caspases. Les deux voies de l'apoptose seraient impliquées dans la perte des cellules musculaires, mais la voie mitochondriale dépendante des caspases serait la voie majoritairement activée.

tel-00719700, version 1 - 20 Jul 2012

tel-00719700, version 1 - 20 Jul 2012

➢ *Au cours du vieillissement et de l'inactivité physique*

Les deux voies de l'apoptose seraient activées au cours des atrophies induites par l'inactivité physique chez des animaux âgés (Andrianjafiniony et coll. 2010). Dans les muscles *gastrocnemius* de rats suspendus il y a une réponse différente de l'apoptose entre des animaux adultes et des animaux âgés : ainsi une augmentation de l'apoptose et de ses marqueurs est enregistrée après 7 jours d'inactivité chez les animaux jeunes et âgés, mais cette augmentation ne persisterait à 14 jours que chez les animaux âgés (Siu et coll. 2005). De même l'index apoptotique est augmenté de 600% dans les muscles *plantaris* de rats âgés suspendus comparé à des rats adultes (Leeuwenburgh et coll. 2005 ; Pistilli et coll. 2006b). Une augmentation de l'apoptose des noyaux des fibres musculaires est observée après 4 semaines de dénervation comparativement à des rats adultes immobilisés (van der Meer et coll. 2011).

En conclusion, les deux voies de l'apotose seraient impliquées dans la perte des cellules musculaires chez des animaux âgés immobilisés. Au cours de ces situations génératrices d'atrophie, l'apoptose serait plus importante chez des animaux âgés que chez des animaux adultes.

4.2. La différenciation/régénération cellulaire

➢ *Au cours du vieillissement*

La régénération des muscles squelettiques semble fortement diminuée au cours de l'avancée en âge (Grounds 1998 ; Conboy et coll. 2003). Une diminution du nombre de cellules satellites (cellules indifférenciées à l'origine des cellules musculaires) et/ou une réduction de leur fonctionnalité pourrait expliquer la difficulté du muscle âgé sarcopénique à se régénérer après des phases d'atrophie. Ainsi, le nombre de cellules satellites et de noyaux par fibre musculaire est fortement diminué au cours du vieillissement (Kadi et coll. 2004-2005 ; Brack et coll. 2005). De plus, une perte de la fonctionnalité de ces cellules satellites a aussi été mise en évidence au cours de l'âge (Gallegly et coll. 2004 ; Conboy et coll. 2005 ; Brooks et coll. 2009) ; les cellules satellites perdent donc progressivement leur capacité à se différencier et à proliférer au cours du vieillissement (Hawke & Garry 2001 ; Glass 2005). Ces cellules satellites sont plus sensibles à l'apoptose au cours du

vieillissement ce qui contribuerait au défaut de régénération du muscle squelettique (Jejurikar et coll. 2006 ; Dupont-Versteegden et coll. 2006).

En conclusion, la capacité de régénération musculaire semble altérée au cours du vieillissement. Les cellules satellites à l'origine des cellules musculaires semblent en effet fortement impactées par les processus de vieillissement, devenant moins nombreuses et moins fonctionnelles et ne permettant plus de jouer leur rôle de pool réparateur des cellules musculaires.

➢ Au cours de l'inactivité physique chez l'adulte

Les cellules satellites voient leur activité diminuée par l'immobilisation (Schultz et coll. 1994). Une perte du nombre et/ou de l'activité des MRF (facteurs de transcription à l'origine de la différenciation des cellules satellites en myoblastes) peut expliquer ces observations. Ainsi, les MRF sont affectés par ces périodes d'immobilisation : la quantité de protéine Myf-5 est diminuée de 30% dans les muscles *gastrocnemius* de rats adultes immobilisés (Vazeille et coll. 2008). Les capacités de régénération pourraient dépendre du volume de cytoplasme exprimé par noyau, un index dénommé domaine myonucléaire. La taille du domaine myonucléaire, normalement constante, (Allen et coll. 1999) conditionnerait la capacité de régénération d'un tissu plus que le nombre de cellules satellites. Au cours de l'immobilisation, la taille du domaine myonucléaire est diminuée, en particulier dans les fibres de type I (Tseng et coll. 1994 ; Allen et coll. 1995 ; Aravamudan et coll. 2006).

En conclusion, l'inactivité physique induit une diminution de la régénération musculaire qui va participer à la génération de l'atrophie musculaire. Une perte de nombre et/ou d'activité des facteurs de transcription MRF pourrait être l'une des causes de cette baisse de la régénération musculaire.

➢ Au cours du vieillissement et de l'inactivité physique

Peu d'études se sont intéressées à l'effet de l'interaction de l'inactivité physique et de l'âge sur la régénération cellulaire. Après une période d'immobilisation, des animaux âgés sont incapables de récupérer la masse musculaire perdue, contrairement à des animaux adultes, ceci traduisant l'impossibilité d'une récupération musculaire correcte (Zarzhevsky

tel-00719700, version 1 - 20 Jul 2012

tel-00719700, version 1 - 20 Jul 2012

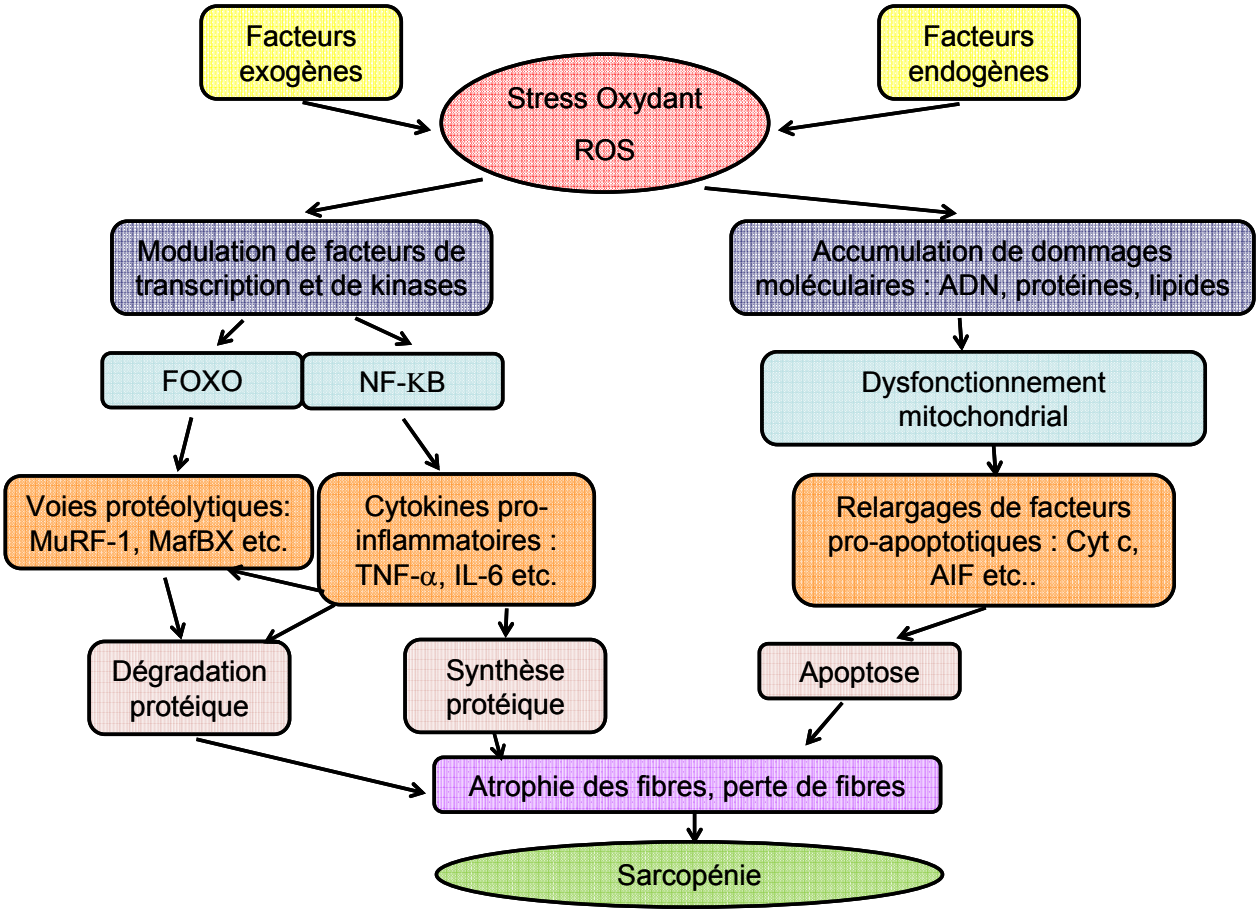


Figure 31 : Rôle du stress oxydant et des radicaux libres dans l'atrophie musculaire.

et coll. 2001a-2001b) et donc une probable atteinte des voies menant à la différenciation/régénération des cellules musculaires. Chez des rats âgés de 25 mois immobilisés, la taille du domaine myonucléaire serait diminuée mais de façon identique à des animaux adultes (van der Meer et coll. 2011). L'absence de récupération musculaire semblerait donc plutôt due à une atteinte du nombre et/ou de la fonctionnalité des cellules satellites et/ou de leurs régulateurs.

En conclusion, chez des animaux âgés soumis à l'inactivité physique, la capacité de régénération musculaire serait altérée, conduisant ainsi à une perte des cellules musculaires.

5. Rôle du stress oxydant et de l'inflammation dans les atrophies musculaires liées au vieillissement ou à l'inactivité physique

Dans une cellule saine, il existe un équilibre entre la production physiologique d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), principalement par la mitochondrie, et les capacités antioxydantes de cette cellule. Le stress oxydant correspond à une surproduction de ROS et/ou une diminution des capacités antioxydantes (Sies 1997). Le stress oxydant se manifeste par des modifications des macromolécules (carbonylation des protéines et péroxydation lipidique) qui altèrent leur structure et leurs fonctions.

La production prolongée de ROS entraîne l'activation des voies menant à l'apoptose et à la protéolyse (Ji et coll. 2006) (**Figure 31**). Ainsi, les ROS peuvent notamment activer la caspase-3, caspase effectrice de l'apoptose cellulaire, dans de nombreuses cellules en particulier la cellule musculaire (Primeau et coll. 2002). De plus, le stress oxydant associé à une atrophie musculaire est corrélé à une activation de la protéine FoxO3a (Brunet et coll. 2004 ; Cai et coll. 2004b ; Essers et coll. 2004 ; Storz 2006 ; Moylan & Reid 2007), facteur de transcription ayant un rôle central dans l'activation de diverses voies protéolytiques. L'activation des voies protéolytiques par le stress oxydant pourrait être médiée par l'activation directe du facteur de transcription NF-κB (Li et coll. 1998-2003a ; Storz 2006) dans de nombreux types cellulaires dont les cellules musculaires (Furukawa-Hibi et coll. 2002). En effet, le facteur de transcription NF-κB est capable d'induire la transcription de l'enzyme E3 ligase MuRF1, responsable de la reconnaissance spécifique des substrats à dégrader par le protéasome, et ceci induit une importante perte de muscle chez la souris (Cai et coll. 2004b ; McKinnell & Rudnicki 2004). L'activation des voies

tel-00719700, version 1 - 20 Jul 2012

protéolytiques par le stress oxydant pourrait aussi passer par d'autres médiateurs : ainsi, le TNF-α, une cytokine pro-inflammatoire et principal médiateur de l'inflammation, peut aussi activer la dégradation protéique dans les muscles squelettiques (Li et coll. 1998) via l'activation de la voie ubiquitine-protéasome-dépendante (Llovera et coll. 1997). Il est notamment capable d'activer la transcription des gènes des enzymes E3 ligases spécifiques du muscle, MuRF1 et MAFbx/Atrogin-1 (Li et coll. 2003b-2005 ; Cai et coll. 2004b).

Le TNF-α pourrait aussi avoir un rôle négatif sur la différenciation des cellules musculaires : ainsi, le traitement de myoblastes C2C12 et de myoblastes humains avec du TNF-α se traduit par une réduction de l'expression des gènes de MyoD et de la myogénine (MRF régulant la différienciation des cellules satellites indifférenciées en myoblastes) et de protéines de la voie de signalisation régulant la traduction des protéines (mTOR, S6K1 et 4E-BP1) (Chandran et coll. 2007 ; Frost et coll. 1997-2003 ; Guttridge et coll. 2000 ; Strle et coll. 2004 ; Williamson et coll. 2005 ; Stewart et coll. 2004). Le TNF-α serait donc doublement impliqué dans l'apparition d'une atrophie musculaire induite par la « décharge musculaire » : d'une part en jouant sur la balance protéique du muscle (en stimulant la dégradation des protéines musculaires), d'autre part en jouant sur la balance cellulaire du muscle (en inhibant la régénération/différenciation de nouvelles cellules musculaires).

Enfin, l'inflammation rendrait le muscle résistant à l'effet stimulateur des acides aminés (Lang et coll. 2002). Ceci pourrait participer à l'atrophie musculaire au cours de situations cataboliques puisqu'au cours de l'inflammation le muscle nécessiterait alors davantages d'acides aminés afin d'assurer une synthèse protéique identique, au détriment du compartiment musculaire.

➢ *Au cours du vieillissement*

Le vieillissement est associé à une production accrue de ROS cytosoliques chez l'animal (Hyun et coll. 2006 ; Martin & Grotewiel 2006 ; Yu & Chung 2006), en particullier dans les muscles glycolytiques (Capel et coll. 2004). Ces ROS sont générées par la mitochondrie en réponse à des augmentations de concentration en calcium, comme cela a pu être démontré pour le péroxyde d'hydrogène (Capel et coll. 2005a-2005b). Les ROS vont induire des modifications structurales et fonctionnelles des macromolécules, en particulier une oxydation des protéines. En effet, l'étude de muscles *gastrocnemius* de rats âgés a montré une augmentation de 50% de la quantité de protéines carbonylées comparé à

tel-00719700, version 1 - 20 Jul 2012

des rats adultes (Reznick & Packer 1994). Or les protéines oxydées sont orientées vers la dégradation (Levine et coll. 1996). Ces ROS peuvent aussi induire l'apoptose mitochondriale ; leur augmentation permettrait donc en partie d'expliquer l'augmentation de l'apoptose observée dans les muscles âgés. De plus, une approche par « Gene Chip » a pu mettre en évidence une régulation positive de 27 gènes associés aux processus inflammatoires liés à la production de radicaux libres (Giresi et coll. 2005).

Le vieillissement est aussi associé à la mise en place d'une inflammation chronique à bas bruit qui peut inhiber la synthèse protéique (Howard et coll. 2007 ; Balage et coll. 2009 ; Rieu et coll. 2009). Ainsi, l'utilisation d'ibuprofène, une molécule anti-inflammatoire, permet de restaurer le défaut de synthèse protéique au cours du vieillissement (Rieu et coll. 2009). Une étude récente de Cuthbertson et coll. a montré que les niveaux protéiques du facteur de transcription NF-κB étaient 4 fois plus importants dans les muscles de sujets âgés comparés à des sujets adultes (2005). Ceci peut être expliqué par le fait que le vieillissement semble aussi affecter la voie de signalisation menant à l'activation de NF-κB via le TNF-α. Ainsi, les protéines intermédiaires de cette voie de signalisation (IKKγ, IκBα et p65) sont augmentées au cours de l'âge dans les muscles *soleus*. Le TNF-α stimule à la fois les processus inflammatoires et apoptotiques mais aucune étude à ce jour n'a pu expliquer son implication exacte dans les muscles au cours du vieillissement.

En conclusion, le vieillissement s'accompagne d'une augmentation des phénomènes inflammatoires et d'oxydation suceptible de stimuler la perte des protéines musculaires et de perturber la synthèse des protéines musculaires.

➢ Au cours de l'inactivité physique chez l'adulte

Il est maintenant bien établi que l'immobilisation des muscles, comme l'exercice physique, entraîne un stress oxydant au sein des fibres musculaires (St-Amand et coll. 2001 ; Nikawa et coll. 2004 ; Powers et coll. 2007 ; Biolo et coll. 2008). Ainsi, une série d'études a montré que l'immobilisation des membres inférieurs entraînait un stress oxydant dans les cellules musculaires suivi par une atrophie des muscles immobilisés (Carmeli et coll. 1993 ; Fares et coll. 1996). Ces observations sont confirmées par une augmentation des marqueurs du stress oxydant (Lawler et coll. 2003 ; Arbogast et coll. 2007 ; Siu et coll. 2008 ; Guillot et coll. 2008) notamment une augmentation de l'oxydation des protéines,

tel-00719700, version 1 - 20 Jul 2012

que ce soit avec un modèle d'immobilisation par plâtrage (Kondo et coll. 1993), ou de suspension (Lawler et coll. 2003 ; Matuszczak et coll. 2004 ; Arbogast et coll. 2007). Ceci est retrouvé chez l'homme ; en effet l'alitement chez des adultes entraîne une augmentation du contenu en protéines carbonylées, qui est un marqueur du stress oxydant (Vescovo et coll. 2008 ; Dalla Libera et coll. 2009). Concernant la péroxidation lipidique, 4 semaines d'immobilisation entraînent une accumulation de 258% des diènes conjugués (Reznick 1995) et une augmentation des TBARS (*Thiobarbituric Acid Reactive Substances*) de 65% ainsi qu'une diminution du glutathion total intramusculaire (GSH) et une augmentation du glutathion disulfite intramusculaire sous sa forme oxydée (GSSG) (Kondo et coll. 1991), le rapport GSH/GSSG (qui est un index de l'état d'oxydation dans la cellule) allant dans le sens de la présence d'un stress oxydant. Chez l'homme, le groupe de Biolo a montré que les taux de glutathion et sa synthèse sont inchangés dans les érythrocytes après 5 semaines d'alitement (Biolo et coll. 2008 ; Agostini et coll. 2010). L'augmentation du stress oxydant peut entraîner une réduction de la prise alimentaire par la production de cytokines aneroxigènes et cette anorexie peut contribuer à l'atrophie musclaire. Cependant, lorsque le modèle d'inactivité musculaire n'entraîne pas de diminution de la prise alimentaire, l'inactivité physique peut entraîner une augmentation du glutathion total (Crowe et coll. 2007) afin de lutter contre le stress oxydant induit. En effet, la disponibilité des acides aminés constitutifs du glutathion influence directement sa synthèse. En cas de diminution de la prise alimentaire, les quantités d'acides aminés sont fortement diminuées et la synthèse du glutathion est restreinte, rendant la lutte contre le stress oxydant difficile. Ce stress oxydant observé lors des atrophies induites par l'inactivité physique stimule la dégradation protéique via les calpaïnes et la caspase-3 (Smuder et coll. 2010). Il existe donc des liens étroits entre le stress oxydant, la protéolyse et l'apoptose au cours de l'inactivité physique chez l'adulte.

Une surproduction de ROS a également pu être observée dans différents modèles d'immobilisation (Kondo et coll. 1991-1993 ; O'Leary & Hood 2008 ; Muller et coll. 2007 ; Powers & Jackson 2008). Au cours de l'inactivité musculaire, les ROS sont majoritairement produits par la mitochondrie (Kavazis et coll. 2009). Ces ROS semblent participer à l'atrophie musculaire au cours de l'immobilisation en activant les systèmes protéolytiques : ils peuvent notamment perturber l'homéostasie calcique au cours de l'immobilisation (Kandarian & Stevenson 2002) et ainsi activer la voie calpaïne

tel-00719700, version 1 - 20 Jul 2012

tel-00719700, version 1 - 20 Jul 2012

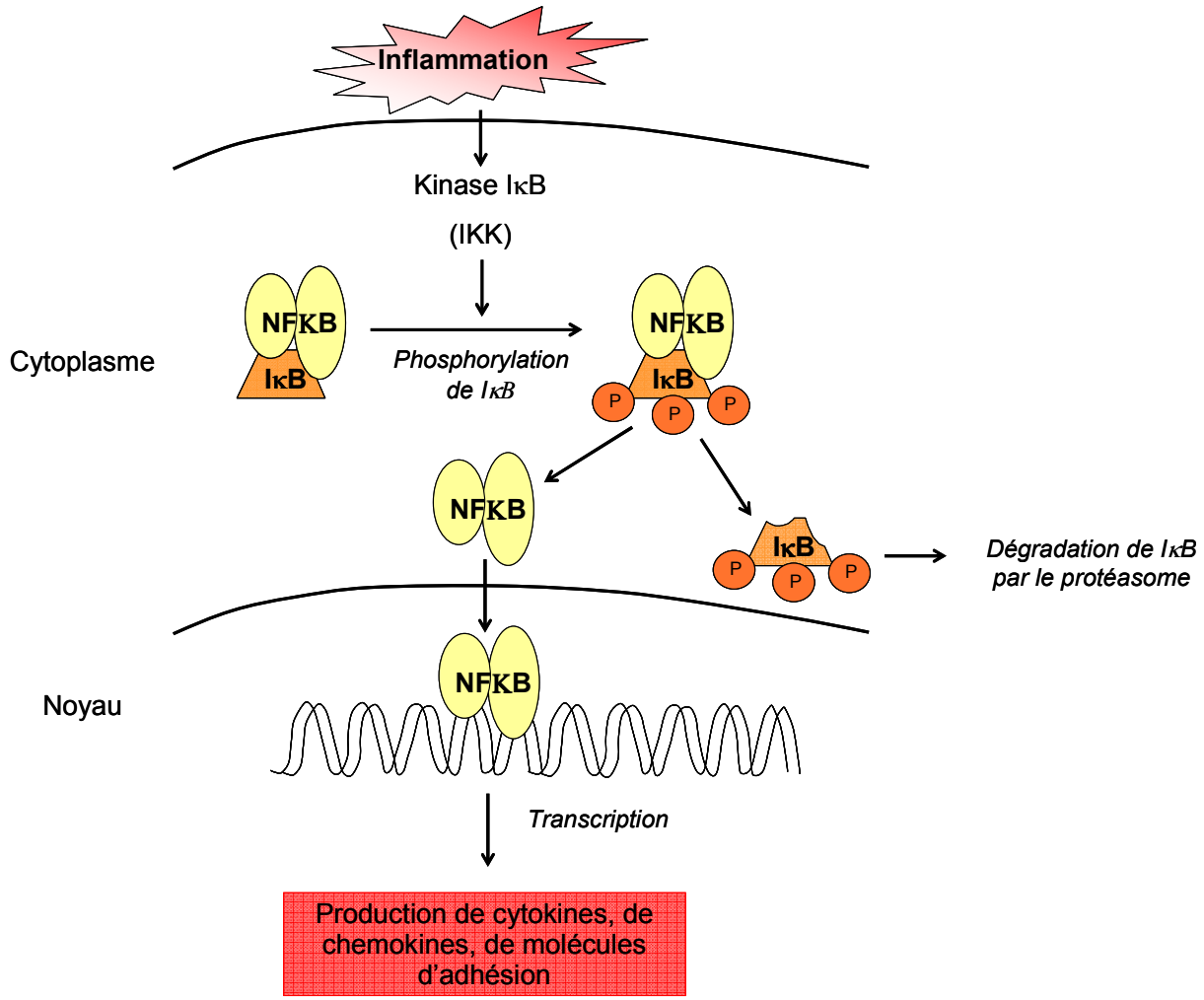


Figure 32 : Rôle des protéines IκB dans la voie de signalisation du facteur de transcription NF-κB.

dépendante, mais aussi activer la transcription des gènes des enzymes E2 et E3 de la voie ubiquitine-protéasome-dépendante (Li et coll. 2003b).

De plus, il y a une inflammation locale induite par les dommages cellulaires générés au cours de l'atrophie (Kasper 1995 ; McClung et coll. 2007). Ainsi, l'immobilisation chez des rats jeunes entraîne une augmentation précoce des processus inflammatoires avec une augmentation de la production des cytokines pro-inflammatoires. Par exemple, une augmentation des taux d'ARNm du TNF-α, de l'Il-6 et de l'Il-1 a pu être observée chez des animaux adultes immobilisés (Caron et coll. 2009). De la même façon, l'activité du facteur de transcription NF-κB est augmentée au cours de la « décharge musculaire » (Hunter et coll. 2002-2004 ; Farid et coll. 2005 ; Judge et coll. 2007), celui-ci pouvant activer soit les voies de la protéolyse soit les voies de l'inflammation.

En conclusion, l'inactivité physique est caractérisée par la mise en place d'un fort stress oxydant et d'une inflammation. Ceux-ci sont bien connus pour entraîner la dégradation des protéines et perturber la synthèse des protéines musculaires, participant ainsi à la mise en place de l'atrophie musculaire.

➢ *Au cours du vieillissement et de l'inactivité physique*

Au cours de l'immobilisation chez le rat âgé le facteur de transcription NF-κB est régulé selon deux phases : son activité est d'abord diminuée pendant les deux premières semaines puis augmentée par la suite (Bar-Shai et coll. 2005). De plus, une différence semble exister entre la réponse des rats adultes et des rats âgés immobilisés. Ainsi, la voie impliquant les protéines IκB est activée au cours de l'immobilisation mais semble plus augmentée chez les rats âgés que chez les rats jeunes (Bar-Shai et coll. 2005). Les protéines IκB sont des inhibiteurs du facteur de transcription NF-κB qu'elles retiennent dans le cytoplasme, rendant son rôle de facteur de transcription impossible (**Figure 32**). Dans les premières phases de l'immobilisation, l'inflammation serait donc moins importante chez le rat âgé.

Chez l'homme âgé sédentaire, l'augmentation des perturbations du statut redox et une inflammation systémique chronique seraient plus importantes que chez des personnes âgées actives (Safdar et coll. 2010). La présence d'un fort stress oxydant (augmentation de la nitrotyrosine et du peroxyde d'hydrogène) ainsi que de la péroxydation lipidique

tel-00719700, version 1 - 20 Jul 2012

(augmentation des malonedialdéhydes) est plus importante chez des animaux immobilisés âgés de 30 mois comparés à des animaux immobilisés agés de 6 mois (Siu et coll. 2008). L'ensemble de ces observations tend à démontrer l'existence de phénomènes inflammatoires et d'oxydation plus importants au cours du vieillissement comme si l'organisme âgé était incapable de contenir les phénomènes inflammatoires et d'oxydation « normalement » associés à l'inactivité physique.

En conclusion, l'immobilisation chez l'homme ou l'animal âgé entraîne la mise en place d'une inflammation et d'un stress oxydant qui vont pouvoir participer à l'atrophie musculaire.

6. Récupération musculaire suite à l'immobilisation

6.1. Mécanismes généraux chez l'adulte

La récupération musculaire est nettement moins étudiée que la phase d'atrophie générée par des périodes d'immobilisation. Elle consiste en la réparation et le renouvellement des fibres musculaires et en un gain de protéines musculaires. Chez des rats adultes immobilisés pendant 2 semaines par suspension et ayant perdu 73% de la masse des muscles *soleus* et principalement des fibres de type I, 14 jours de récupération musculaire permettent une récupération totale des fibres (Sugiura et coll. 2005 ; Oishi et coll. 2008). Ainsi, les perturbations histologiques et biochimiques générées par l'atrophie sont normalisées après 14 jours de récupération dans les muscles *soleus* de souris immobilisées par suspension (Mitchell & Pavlath 2001). Chez le rat adulte immobilisé par plâtrage, la récupération musculaire n'est complète qu'après 40 jours de récupération musculaire (Vazeille et coll. 2008). Ce phénomène de récupération est précoce car de nouvelles fibres musculaires ont été observées dans les muscles *soleus* après seulement 4 jours de récupération chez des rats immobilisés (Hortobagy et coll. 2000).

- *Gain de fibres musculaires*

Concernant la réparation des fibres musculaires, les cellules satellites sont essentielles au cours de la régénération : elles vont servir à la réparation des fibres lésées par l'incorporation de leurs noyaux dans les fibres musculaires en reconstruction (Moss et coll. 1971 ; Schults et coll. 1994). La capacité de prolifération et de différenciation des cellules

tel-00719700, version 1 - 20 Jul 2012

satellites en myocytes matures apparaît comme l'un des points clés de la croissance et de la réparation musculaire (Hawke & Garry 2001). Le facteur myogénique MyoD, activé lors des phases de régénération musculaire, régulerait l'expression des CMH de type IIB sur des cellules C2C12 en culture (Allen et coll. 2001). Une normalisation des niveaux protéiques de myf-5, marqueur précoce de la différenciation des cellules satellites fortement diminué au cours de la phase d'atrophie, est observée en phase de récupération (Vazeille et coll. 2008). Ceci suggère l'activation des cellules satellites à des fins de différenciation et donc, *in fine*, à la mise en place des processus de régénération musculaire. La balance entre régénération/différenciation musculaire et apoptose cellulaire joue un rôle déterminant dans le gain de cellules. Les deux phénomènes pourraient être finement imbriqués. Ainsi, des études suggèrent un rôle de l'apoptose au cours de la récupération, notamment dans l'activation du programme myogénique permettant de remplacer les cellules endommagées. En effet, l'apoptose serait indispensable dans les premiers stades de la récupération musculaire. Il a été montré que l'inhibition de la caspase-3, caspase effectrice de l'apoptose, réprimait la fusion des myoblastes et la formation de myotubes sur des cellules C2C12 en culture (Fernando et coll. 2002). Le fait que l'apoptose ne soit normalisée qu'après 10 et 14 jours de récupération (Oishi et coll. 2008 ; Vazeille et coll. 2008) permettrait donc de maintenir une activité de la caspase-3 qui favoriserait la régénération (Vazeille et coll. 2008). Cependant, au-delà de cette période précoce, une diminution de l'apoptose est observée avec notamment une régulation des activités des caspases -3 et -9 en-dessous de leurs valeurs basales (Vazeille et coll. 2008) et ceci potentialiserait la récupération dans les phases plus tardives.

➢ *Gain de protéines musculaires*

Concernant le métabolisme protéique, un gain de protéines nécessite une normalisation des voies de synthèse et de dégradation protéique afin de stopper la perte de protéines, voire une diminution de la dégradation et/ou une augmentation de la synthèse protéique au-dessus des valeurs basales afin de gagner des protéines. La rétention azotée et la synthèse protéique au niveau corps entier sont améliorées chez le rat suspendu dans les premières phases de la récupération musculaire (Stein et coll. 2002). Les gènes du métabolisme protéique sur-régulés et sous-régulés au cours de l'immobilisation reviennent à leurs valeurs basales après quelques heures de récupération (Sartorelli & Fulco 2004) pouvant traduire une normalisation du métabolisme protéique. Ceci se traduit par une récupération

tel-00719700, version 1 - 20 Jul 2012

relativement rapide de la surface des fibres et de la masse musculaire (Thomason et coll. 1989 ; Kasper et coll. 1990 ; Isfort et coll. 2002 ; Taillandier et coll. 2003 ; Childs et coll. 2003 ; Sugiura et coll. 2005 ; Sitnik et coll. 2006).

La protéolyse ubiquitine-protéasome-dépendante augmentée au cours de la suspension reste élevée dans les muscles après 18h de désuspension et normalisée après 7 jours de récupération (Taillandier et coll. 2003). Ceci suggérerait que cette voie protéolytique serait régulée selon deux phases au cours de la période de récupération musculaire : une première phase où l'activité de cette voie resterait élevée afin d'éliminer les protéines endommagées au cours de la phase d'atrophie, et une seconde phase de normalisation. Ainsi, les ARNm des enzymes E3 ligases MuRF1 et MAFbx/Atrogin-1, augmentés au cours de l'immobilisation, sont normalisés dès les 24 premières heures de récupération (Jones et coll. 2004) et les activités chymotrypsine-like et trypsine-like du protéasome sont normalisées au dixième jour de récupération après une immobilisation par plâtrage (Vazeille et coll. 2008).

La synthèse protéique musculaire, quant à elle, est augmentée en période de récupération musculaire chez le rat adulte (Booth 1982). Ainsi, la voie en aval de la protéine Akt, incluant la protéine S6, est activée très tôt au cours de la récupération suivant l'inactivité physique, suggérant que la récupération est facilitée par une augmentation de la protéosynthèse très tôt au cours de la phase de récupération (Sugiura et coll. 2005). En effet, 3 jours de récupération permettent d'augmenter les niveaux de phospshorylation de l'enzyme Akt et de la protéine S6K1 alors que ces niveaux de phosphorylation avaient été largement diminués par 10 jours d'immobilisation (Sugiura et coll. 2005). Après quelques jours de récupération dans les muscles *gastrocnemius* de rats suspendus, les niveaux de phosphorylation des protéines Akt (Bodine et coll. 2001), mTOR (Reynolds et coll. 2002) et S6K1 (Bodine et coll. 2001 ; Hornberger et coll. 2001) reviennent à leur niveau d'avant suspension et quelques jours de récupération suffisent également à récupérer la quantité de protéine 4E-BP1 liée au facteur d'initiation eIF4E, perdue au cours de l'immobilisation (Hornberger et coll. 2001).

➢ *Rôle des processus inflammatoires* :

La place de l'inflammation dans les processus de récupération musculaire est importante (Saint-Pierre & Tidball 1994 ; Nguyen & Tidball 2003a-2003b). Ainsi, il a pu

tel-00719700, version 1 - 20 Jul 2012

être mis en évidence une infiltration des tissus lésés par les macrophages qui sécrètent des ROS ainsi que le TNF-α (Lawler et coll. 2003 ; Andrianjafiniony et coll. 2010). Une sécrétion d'IL-6 semble indispensable pendant la régénération musculaire suivant une atrophie induite par suspension (Childs et coll. 2003 ; Washington et coll. 2011). En effet, cette cytokine pourrait permettre d'activer la prolifération des cellules musculaires (Cantini et coll. 1995) en particulier des cellules satellites (Hawke & Garry 2001) et donc ainsi de favoriser la récupération musculaire par l'apparition de nouveaux myocytes fonctionnels. De plus l'inhibition de l'IL-6 en période de récupération musculaire chez des souris suspendues pendant 10 jours entraîne une inactivation de la voie Akt/mTOR et une diminution des ARNm de MyoD et de la myogénine (Washington et coll. 2011) confirmant le rôle central de cette cytokine dans la récupération musculaire.

6.2. Au cours du vieillissement

Les mécanismes impliqués dans la récupération musculaire chez des animaux ou des sujets âgés sont assez peu documentés. Il y aurait toutefois une régulation différente de la récupération musculaire au cours du vieillissement : ainsi, par une analyse différentielle des ARNm entre des animaux adultes et des animaux âgés immobilisés, il a pu être mis en évidence une quantité des ARNm de fibres IIB et des fibres IIX respectivement 16 et 25 fois plus importante dans les muscles *soleus* d'animaux adultes pouvant expliquer que la récupération de masse soit observée chez des adultes mais pas chez les âgés (Pattison et coll. 2003a). Ce défaut de récupération semble aussi toucher l'homme : une étude d'immobilisation par plâtrage d'hommes âgés de 67 ans montre que ces personnes ne récupèrent pas la force et la taille des fibres musculaires en période de récupération contrairement à des sujets adultes de 24 ans (Hvid et coll. 2010).

Comme la récupération musculaire implique forcément une activation de la régénération/différenciation de nouvelles cellules musculaires, ce défaut de récupération musculaire pourrait être dû à une altération de ces processus. Ainsi, après 2 semaines d'immobilisation, Carlson et coll. ont comparé les processus de régénération et de récupération entre des hommes adultes de 20 ans et des hommes âgés de 70 ans. Les résultats de cette étude montrent que le potentiel de régénération intrinsèque était maintenu chez les sujets âgés, mais rendu impossible à cause de leur environnement modifié par le

tel-00719700, version 1 - 20 Jul 2012

vieillissement (diminution de TGF-β circulant, perte du signalling des MAP kinases etc.) (Carlson et coll. 2009).

Au cours du vieillissement, la capacité intrinsèque du muscle à récupérer d'une situation d'atrophie semble inaltérée, cependant le gain de masse musculaire en période de récupération semble impossible.

L'atrophie musculaire liée à l'âge peut être en partie expliquée par des déséquilibres des balances protéique et cellulaire au niveau du muscle. En effet, le muscle devient particulièrement résistant aux signaux anaboliques (Balage & Dardevet 2010) et la voie de dégradation protéique majeure (voie ubiquitine-protéasome-dépendante) semble particulièrement inadaptable (Combaret et coll. 2009). Le déséquilibre de la balance apoptose/régénération musculaire observé au cours du vieillissement, associé à ces perturbations du métabolisme protéique, permettrait d'expliquer la sarcopénie. Ces phénomènes pourraient en partie être expliqués par l'apparition d'une inflammation à bas bruit et/ou le développement d'un stress oxydant (Marzani et coll. 2008 ; Rieu et coll. 2009).

Au cours de l'inactivité physique chez des sujets ou animaux adultes, l'atrophie serait sous la dépendance d'une diminution de la synthèse protéique musculaire et d'une augmentation de la dégradation des protéines. Cette augmentation de la protéolyse serait associée à une augmentation concommittente de l'apoptose cellulaire. Cependant, peu d'études ont caractérisé ces mécanismes chez des sujets âgés malgré leur potentielle participation dans le phénomène de sarcopénie. Quant à la récupération musculaire, elle reste à ce jour assez peu étudiée, particulièrement chez la personne âgée.

tel-00719700, version 1 - 20 Jul 2012

Chapitre 3 : Nutrition protéique et récupération musculaire

Il est établi depuis longtemps que le moyen le plus efficace de gagner de la masse et de la force musculaire est l'exercice physique. Ainsi, la pratique d'une activité physique en résistance a montré des effets positifs sur l'augmentation de la masse musculaire, même chez le sujet âgé. Chez la personne âgée en bonne santé, la pratique d'un entraînement régulier en endurance permet d'augmenter la synthèse des protéines musculaires de 30 à 50% (Yarashevski et coll. 1999 ; Nair 2005 ; Short et coll. 2005). Cependant, la pratique d'une telle activité physique n'est pas toujours possible chez la personne âgée qui s'est retrouvée alitée sur une longue période (pathologie, traumatisme, etc.). D'autres stratégies doivent alors être envisagées. La nutrition est l'une d'entre elle.

1. Régulations nutritionnelles du métabolisme protéique musculaire

1.1. Effet des acides aminés sur la protéosynthèse et la protéolyse musculaires : effet de l'âge

La régulation du métabolisme protéique musculaire dépend de la disponibilité des acides aminés au niveau intramusculaire (Wolfe & Miller 1999). Ainsi, en période postprandiale, les acides aminés ingérés vont pouvoir servir de substrats pour la synthèse protéique dans le muscle.

Les acides aminés peuvent en effet stimuler l'anabolisme musculaire (Wolfe 2002 ; Rennie et coll. 2004) par stimulation de la synthèse protéique musculaire et inhibition de la protéolyse (May & Buse 1989 ; Biolo et coll. 1997 ; Bohé et coll. 2001 ; Carroll et coll. 2005; Garlick 2005 ; Bohé et coll. 2001 ; Mittendorfer et coll. 2005). Ceci permet de générer une balance azotée équilibrée et ainsi de maintenir la masse musculaire constante. Ainsi, des concentrations élevées d'acides aminés obtenues par incubation, par perfusion ou par administration orale entraînent une stimulation de la synthèse protéique musculaire *in vitro* (Li & Jefferson 1978) et *in vivo* (Biolo et coll. 1997 ; Mosoni et coll. 1993 ; Volpi

tel-00719700, version 1 - 20 Jul 2012

tel-00719700, version 1 - 20 Jul 2012

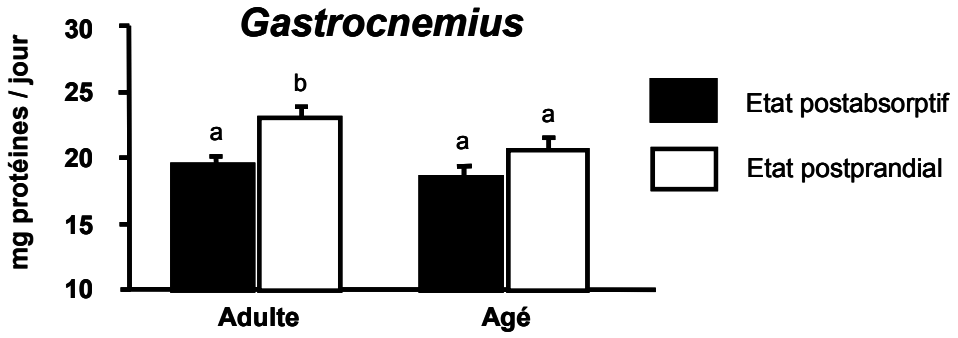


Figure 33 : Effet stimulateur comparé des acides aminés sur la synthèse protéique musculaire chez le rat adulte et le rat âgé *(d'après Dardevet et coll. 2002).*

et coll. 1999). En revanche, une diminution importante de l'aminoacidémie (-40 %) est associée à une diminution importante de la synthèse des protéines musculaires (Kobayashi et coll. 2003). Cet effet des acides aminés sur le métabolisme protéique musculaire est donc une étape clé et directe de la régulation de la masse musculaire.

Cet effet des acides aminés sur le taux de renouvellement protéique musculaire, associé à l'effet global de la prise alimentaire, est altéré chez la personne âgée (Wakimoto & Block 2001 ; Rousset et coll. 2003 ; Balage & Dardevet 2010). Ceci est confirmé par le fait que l'effet inhibiteur du repas sur la protéolyse est altéré au cours du vieillissement (Boirie et coll. 1997 ; Arnal et coll. 1999) et il en est de même sur son effet stimulateur de la protéosynthèse et ceci a été détecté à la fois chez le rat âgé (Mosoni et coll. 1995 ; Dardevet et coll. 2002) (**Figure 33**) et l'homme âgé (Welle et coll. 1994). Ceci résulterait en un déséquilibre de la balance azotée caractéristique d'une perte protéique, et contribuerait à la perte progressive de masse musculaire liée à l'âge. La moindre réponse anabolique aux acides aminés pourrait impliquer la voie de signalisation mTOR, dont le niveau de phosphorylation (traduisant son activation) est diminué chez des personnes âgées par rapport à des individus jeunes (Cuthbertson et coll. 2005). Augmenter la quantité de protéines ingérées, et donc la biodisponibilité en acides aminés, permettrait une augmentation du taux de renouvellement protéique au niveau corps entier et ainsi une augmentation de la balance azotée chez la personne âgée (Arnal et coll. 1999-2002 ; Paddon-Jones et coll. 2006). Toutefois, ce type de régime doit être utilisé avec prudence chez la personne âgée dont le rein (principal excréteur de l'urée issu du catabolisme des acides aminés) fonctionne moins bien.

1.2. Effet d'acides aminés spécifiques

Certains acides aminés semblent être plus importants que d'autres pour l'anabolisme protéique musculaire. Ainsi, les acides aminés essentiels possèdent à eux seuls un rôle stimulateur de la synthèse protéique musculaire. Plusieurs études ont démontré que l'ingestion d'un mélange d'acides aminés essentiels avait le même effet stimulateur sur la synthèse protéique qu'un mélange global d'acides aminés (Tipton et coll. 1999 ; Rasmussen et coll. 2000 ; Volpi et coll. 2003). De même, un bolus d'acides aminés essentiels (Paddon-Jones et coll. 2004 ; Katsanos et coll. 2005) permet d'améliorer la balance protéique même chez la personne âgée chez qui l'effet stimulateur des acides

tel-00719700, version 1 - 20 Jul 2012

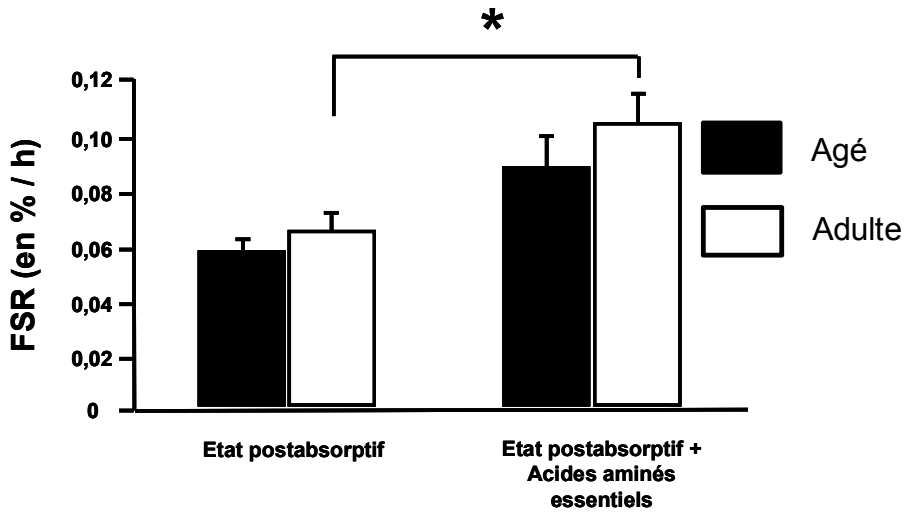


Figure 34 : Effet des acides aminés essentiels sur la synthèse protéique musculaire chez l'homme âgé *(d'après Paddon-Jones et coll. 2004).*

FSR : fractional synthetic *rate (taux de synthèse fractionnaire des protéines)*

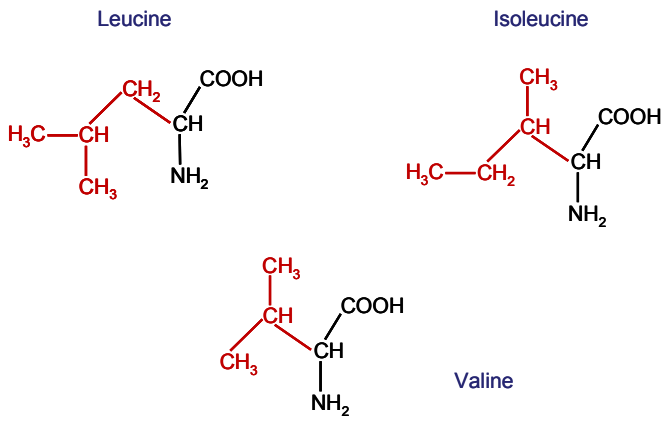


Figure 35 : Les acides aminés à chaînes ramifiées.

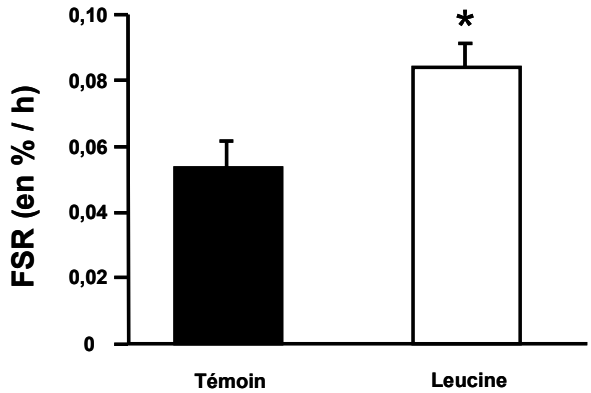


Figure 36 : Impact d'une supplémentation en leucine sur la synthèse protéique chez l'homme âgé *(d'après Rieu et coll. 2006).*

FSR : fractional synthetic rate (taux de synthèse fractionnaire des protéines)

tel-00719700, version 1 - 20 Jul 2012

aminés est pourtant réduit (**Figure 34**). Parmi les acides aminés essentiels, les 3 acides aminés à chaînes ramifiées (**Figures 35**) (leucine, isoleucine et valine) semblent avoir un rôle particulier. Ils pourraient à eux seuls posséder un effet anabolique sur le métabolisme protéique (Alvestrand et coll. 1990 ; Louard et coll. 1990 ; Nair et coll. 1992). Ainsi, l'administration de ces 3 acides aminés à des doses supra-physiologiques (Fulks et coll. 1975 ; Li & Jefferson 1978) ou par perfusion à des doses nutritionnelles (Garlick & Grant 1988) permet d'augmenter la synthèse protéique musculaire aussi efficacement qu'un mélange complet d'acides aminés. Ces acides aminés pourraient de plus inhiber la dégradation des protéines dans le muscle (Louard et coll. 1990), ce qui expliquerait leur effet anabolique. Récemment, une étude *in vitro* sur cellules C2C12 a montré que les acides aminés à chaînes ramifiés étaient capables d'inhiber l'expression des enzymes E3 ligases MuRF1 et MAFbx/Atrogin-1 (Herningtyas et coll 2008). Ceci pourrait expliquer le mécanisme d'action de ces acides aminés à chaînes ramifiées sur la protéolyse musculaire.

1.3. Effet de la leucine

Parmi les 3 acides aminés à chaînes ramifiées (**Figures 35**), la leucine permet de stimuler la synthèse protéique *in vitro* aussi bien qu'un mélange des 3 acides aminés à chaînes ramifiées (Fulks et col.l 1975 ; Buse & Reid 1975 ; Hong & Layman 1984). Cette observation suggère fortement que l'effet des acides aminés sur la synthèse protéique musculaire pourrait être attribuable à la leucine seule. Cet effet de la leucine a pu être mis en évidence *in vitro* (Buse & Reid 1975 ; Li & Jefferson 1978 ; Smith et coll. 1992) et *in vivo* (Anthony et coll. 1999-2000a ; Dardevet et coll. 2002 ; Koopman et coll. 2005 ; Katsanos et coll. 2006 ; Rieu et coll. 2006) (**Figure 36**). Elle peut notamment stimuler la synthèse de protéines spécifiques dans le muscle comme les protéines mitochondriales et sarcoplasmiques (Guillet et coll. 2004b). L'effet stimulateur de la leucine sur la synthèse protéique a pu être démontré chez des sujets jeunes et chez des sujets âgés, à condition toutefois que la proportion de leucine soit augmentée (41% de leucine pour 6,7g d'acides aminés essentiels chez les sujets âgés contre 26% de leucine pour 6,7g d'acides aminés essentiels chez les sujets jeunes) (Katsanos et coll. 2006). Cependant, l'effet sur le long terme d'une supplémentation en leucine sur la masse musculaire des personnes âgées reste à démontrer.

tel-00719700, version 1 - 20 Jul 2012

Plusieurs études suggèrent que la leucine possèderait aussi un effet anti-protéolytique (Buse & Reid 1975 ; Tischler et coll. 1982 ; Frexes-Steed et coll. 1992 ; Combaret et coll. 2005 ; Nakashima et coll. 2005). En effet, en général, des supplémentations en leucine induisent une diminution de la protéolyse dans le muscle squelettique qu'elle soit perfusée (Tessari et coll. 1987 ; Nair et coll. 1992 ; Louard et coll. 1995 ; Kee et coll. 2003 ; Kobayashi et coll. 2006), ajoutée *in vitro* sur le muscle entier incubé (Buse & Reid 1975 ; Tischler et coll. 1982 ; Busquets et coll. 2000), ajoutée *in vitro* sur des cellules musculaires en culture (Mitchell et coll. 2004 ; Nakashima et coll. 2005) ou donnée par voie orale (Combaret et coll. 2005). Busquets et coll. ont mis en évidence sur des muscles EDL incubés, que la leucine inhibe 25% de la protéolyse musculaire (Busquets et coll. 2002). Cependant, l'amplitude d'inhibition est différente selon l'espèce étudiée (homme ou animal), la voie d'administration et le modèle d'atrophie utilisé.

Les effets de la leucine dépendent également de son mode d'administration et de la durée de la supplémentation. Ainsi, la leucine peut être administrée de façon aiguë, en une prise, ou de façon chronique. Les effets sont observés lorsque la leucine est administrée de façon aiguë, c'est-à-dire lors d'un repas unique (Dardevet et coll. 2002), ou lors d'administration chronique, lors d'une supplémentation de 10 à 12 jours (Lynch et coll. 2002 ; Rieu et coll. 2003).

Dans les muscles squelettiques d'individus âgés, cet effet nécessite d'utiliser des doses 2 à 3 fois plus élevées (Katsanos et coll. 2006) ceci pouvant être expliqué par le fait que des études menées *in vivo* (Dardevet et coll. 2002 ; Guillet et coll. 2004a) et *in vitro* (Dardevet et coll. 2000) montrent une résistance avec l'âge de l'effet stimulateur de la leucine sur la synthèse protéique musculaire. Une supplémentation en leucine permettrait de restaurer la stimulation postprandiale de la protéosynthèse et l'inhibition de la protéolyse (Dardevet et coll. 2003 ; Rieu et coll. 2006) et cet effet stimulateur de la leucine persiste pendant 10 jours au moins lors de supplémentation chronique en leucine. L'ensemble de ces données suggère donc que la résistance à la leucine liée à l'âge et donc une altération du signal leucine pourraient expliquer le défaut d'anabolisme postprandial observé au cours du vieillissement (Rieu et coll. 2003).

Au niveau cellulaire, des études *in vivo* et *in vitro* montrent que l'action de la leucine passerait majoritairement par la voie mTOR via la phosphorylation de cette enzyme (Kimball et coll. 1999 ; Dardevet et coll. 2000 ; Lynch 2001 ; Lynch et coll. 2003). Ainsi, les taux de synthèse protéique musculaire chez des rats traités avec la rapamycine,

tel-00719700, version 1 - 20 Jul 2012

tel-00719700, version 1 - 20 Jul 2012

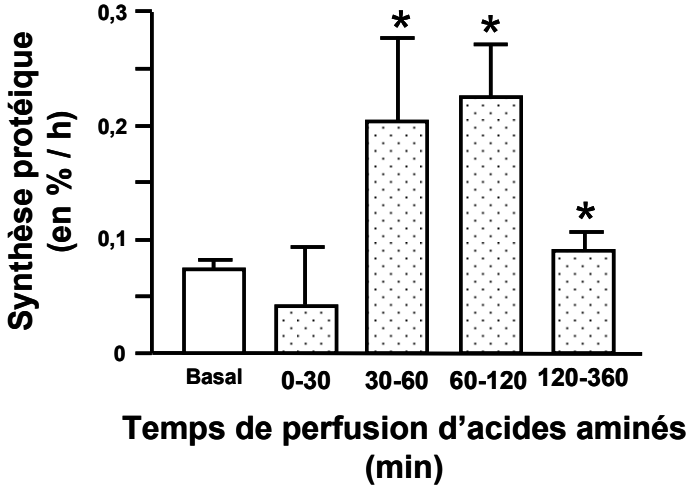


Figure 37 : Effet d'une perfusion d'acides aminés sur la synthèse protéique musculaire de l'homme adulte *(d'après Bohé et coll. 2001).*

l'inhibiteur de la voie mTOR, et supplémentés en leucine ne sont que de 72% comparés à ceux d'animaux uniquement supplémentés en leucine (Anthony et coll. 2001). La leucine activerait en particulier l'étape d'initiation de la traduction dans le muscle squelettique en augmentant la phosphorylation des protéines 4E-BP1 et S6K1 (Anthony et coll. 2000a-2000b ; Fujita et coll. 2007). Cette dernière étape est importante car la protéine S6K1 phosphorylée régule la synthèse des protéines ribosomales et de facteurs d'élongation de la synthèse protéique. Ainsi, l'administration d'acides aminés à chaînes ramifiées ou de leucine seule chez des adultes pendant 2 ou 6h augmente la phosphorylation de S6K1 dans le muscle squelettique (Greiwe et coll. 2001 ; Liu et coll. 2001) sans activer la voie de signalisation d'Akt (Greiwe et coll. 2001).

Concernant son effet inhibiteur sur la protéolyse, cette inhibition pourrait passer par une réduction de l'activité chymotrypsine-like du protéasome (Hamel et coll. 2003 ; Combaret et coll. 2005). La leucine pourrait interférer avec le site catalytique des enzymes du protéasome ou jouer sur l'entrée des substrats dans le core catalytique du protéasome (Hamel et coll. 2003). La leucine serait aussi capable de réduire l'expression des gènes codant pour l'ubiquitine ou l'une des sous-unités du protéasome (Busquets et coll. 2002).

1.4. Vitesse de digestion des protéines : concept des protéines lentes et des protéines rapides

La protéosynthèse musculaire dépend donc du temps et de la quantité d'acides aminés biodisponibles et cette étape peut être limitante. En effet, la vitesse d'apparition des acides aminés au niveau plasmatique dépend de la vitesse de digestion des protéines et de leur comportement au niveau digestif (c'est-à-dire de l'utilisation des acides aminés par l'aire splanchnique). Pour illustrer ce lien entre vitesse d'apparition des acides aminés et protéosynthèse musculaire, Bohé et coll. ont perfusé des acides aminés à des adultes pendant 6h afin d'augmenter leurs concentrations plasmatiques de 70%. Le taux de synthèse protéique était alors augmenté dès 30min et maintenu élevé jusqu'à 2h avant de revenir rapidement aux valeurs basales malgré une disponibilité maintenue en acides aminés (**Figure 37**) (Bohé et coll. 2001). La disponibilité en acides aminés dépend de la vitesse de digestion des protéines (Fouillet et coll. 2009) qui dépend elle-même de leurs caractéristiques physico-chimiques. Ainsi, selon la vitesse de digestion des protéines, l'augmentation de la concentration en acides aminés en phase postprandiale et donc la

tel-00719700, version 1 - 20 Jul 2012

tel-00719700, version 1 - 20 Jul 2012

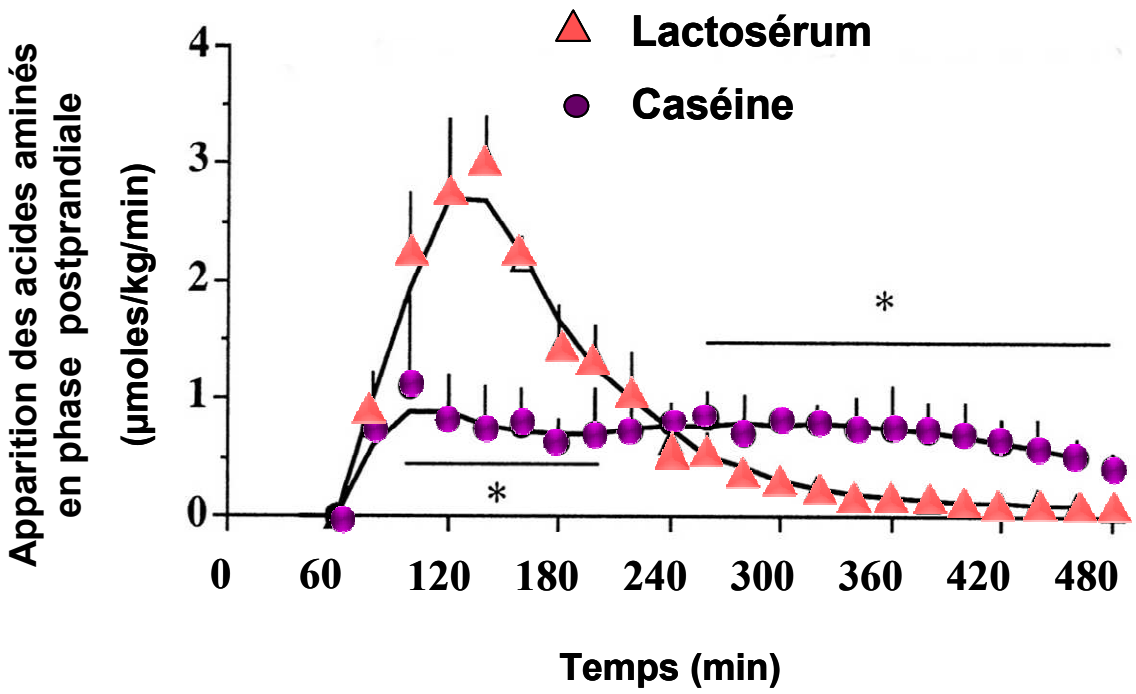


Figure 38 : Vitesse de digestion des protéines chez l'homme : concept des protéines lentes et des protéines rapides *(d'après Boirie et coll. 1997).*

biodisponibilité des acides aminés est différente. Il existe ainsi des protéines à digestion rapide et des protéines à digestion lente (Boirie et coll. 1997) (**Figure 38**).

L'utilisation des différentes protéines du lait illustre parfaitement cette notion de protéines lentes et de protéines rapides : les caséines peuvent précipiter au pH acide de l'estomac et sont donc relarguées dans l'intestin grêle relativement lentement, alors que les protéines du lactosérum restent solubles et sont donc relarguées rapidement dans l'intestin grêle (Cayot & Lorient 1998). Les protéines du lactosérum sont des protéines dites « rapides » : restant solubles à pH acide, elles sont digérées plus rapidement au niveau du tractus digestif et induisent une libération massive mais transitoire des acides aminés dans la circulation sanguine (**Figure 38**) donc une meilleure disponibilité musculaire en acides aminés (Boirie et coll. 1996-1997 ; Dangin et coll. 2001). Les caséines, au contraire, sont des protéines à digestion lente car une fois précipitées dans l'estomac, elles sont digérées plus lentement et induisent une montée postprandiale de l'aminoacidémie plus faible mais prolongée dans le temps (**Figure 38**) (Boirie et coll. 1996-1997 ; Dangin et coll. 2001).

Chez l'individu jeune, la prise de protéines lentes comme la caséine est associée à une meilleure accrétion protéique (Lacroix et coll. 2006) contrairement à la prise de protéines rapides qui vont augmenter rapidement les concentrations plasmatiques en acides aminés (Dangin et coll. 2001). Par contre chez la personne âgée c'est la prise de protéines rapides qui augmente l'utilisation des acides aminés pour le taux de renouvellement protéique total, contrairement à la prise de caséines (Dangin et coll. 2003). Ainsi, un bolus de 15g de protéines de lactosérum permet d'améliorer la balance protéique chez la personne âgée (Boirie et coll. 1997 ; Paddon-Jones et coll. 2006 ; Pennings et coll. 2011).

2. Modulations nutritionnelles du métabolisme protéique musculaire au cours de l'inactivité physique et de la récupération musculaire

2.1. Au cours de l'inactivité physique

- *Chez des sujets adultes*

Les données précédentes suggèrent qu'une nutrition protéique adaptée pourrait être un moyen efficace de limiter la perte de muscle au cours de l'inactivité physique. Ainsi, l'utilisation d'acides aminés spécifiques (tels que les acides aminés à chaînes ramifiées, en

tel-00719700, version 1 - 20 Jul 2012

particulier la leucine) ou de protéines particulières (telles que les protéines de lactosérum, permettant d'augmenter rapidement la biodisponibilité en acides aminés au niveau du muscle) pourrait permettre de moduler le métabolisme protéique afin de réduire le déséquilibre azoté caractéristique d'une atrophie musculaire.

L'utilisation des acides aminés à chaines ramifiées a largement été étudiée au cours des situations d'inactivité physique, en particulier chez l'homme immobilisé. Par exemple, chez des sujets jeunes soumis à 6 jours d'alitement, la prise d'acides aminés à chaînes ramifiées (8,9% leucine, 4,5% isoleucine et 5,4% valine, % de la ration protéique totale) atténue la perte azotée induite par l'alitement (Stein et coll. 1999). Cependant, une supplémentation en acides aminés à chaînes ramifiées chez des femmes adultes soumises à 60 jours d'alitement permet de stimuler la synthèse protéique musculaire, mais pas de limiter la perte de muscle (Trappe et coll. 2007). Chez le rat adulte, une supplémentation spécifique en leucine au cours de l'immobilisation permet d'atténuer la perte de muscle (Baptista et coll. 2010). Ces données suggèrent donc que les acides aminés à chaînes ramifiées pourraient permettre d'atténuer la perte de masse musculaire au cours de périodes d'immobilisation courtes, et que cet effet serait attribuable à la leucine.

Concernant l'utilisation de protéines particulières, peu d'études ont été réalisées. Une étude récente a comparé l'effet de protéines de lactosérum et de caséines données à des adultes alités pendant 12 ou 14 jours : la protéosynthèse était meilleure lorsque les sujets été supplémentés avec des protéines de lactosérum (Antonione et coll. 2008). Le lactosérum étant une protéine à digestion rapide et riche en leucine, cette étude confirmerait 1/ l'effet majeur de la leucine sur le métabolisme protéique musculaire dans de telles situations d'atrophie et/ou 2/l'importance d'une augmentation rapide de la disponibilité des acides aminés au niveau plasmatique, et donc *in fine* au niveau musculaire. D'autres types de protéines pourraient présenter un intérêt dans des situations d'immobilisation. Ainsi, des supplémentations avec 20% de protéines de soja chez le rat permettent de réduire l'activité des calpaïnes et du protéasome et de diminuer l'atrophie induite par la « décharge musculaire » alors que des régimes dont la source protéique est la caséine ne le permettent pas (Tada & Yokogoshi 2002). Concernant leur vitesse d'assimilation, les protéines de soja se situent entre les protéines de lactosérum et les caséines. Elles pourraient donc permettre d'augmenter assez rapidement la biodisponibilité en acides aminés chez l'adulte, et donc de limiter l'atrophie musculaire en stimulant la synthèse protéique et en inhibant la dégradation des protéines. Quelques études réalisées

tel-00719700, version 1 - 20 Jul 2012

chez des animaux adultes ont utilisé des supplémentations nutritionnelles non protéiques à des fins de récupération musculaire. Ainsi, Kondo et coll. ont montré qu'une injection unique de vitamine E à des rats adultes de 15 semaines permettait d'accélérer la récupération musculaire après plâtrage (Kondo et coll. 1993). La vitamine E étant connue pour ses propriétés antioxydantes, elle pourrait permettre de limiter le stress oxydant induit au cours du plâtrage, et donc de limiter la stimulation des voies de dégradation protéique musculaire. De même, la quercétine, un antioxydant retrouvé dans de nombreuses plantes, donnée à des rats adultes suspendus permet de diminuer l'atrophie dans les muscles *gastrocnemius* en diminuant l'expression des enzymes ubiquitines ligases de la voie ubiquitine-protéasome-dépendante (Mukai et coll. 2010). Cependant, chez des rats suspendus, une supplémentation avec un cocktail d'antioxydants permet d'augmenter les capacités anti-oxydantes du muscle mais pas d'inhiber l'atrophie musculaire (Koesterer et coll. 2002). De même, un régime enrichi avec 0,5% de catéchines de thé (des molécules connues pour leurs propriétés anti-oxydantes) donné à des souris adultes immobilisées par suspension permet de prévenir la perte de force musculaire mais sans changer le degré d'atrophie en diminuant l'oxydation des protéines myofibrillaires (Ota et coll. 2011).

Plus récemment, un groupe coréen a montré qu'une supplémentation en huile de poisson, riche en oméga-3, avant et pendant la période d'immobilisation musculaire chez des animaux immobilisés pendant 10 jours, inhibait la récupération musculaire qui était présente chez des animaux témoins non supplémentés (You et coll. 2010). Ce résultat pourrait être attribué à l'effet anti-inflammatoire des omégas 3 ; comme décrit précédemment, l'inflammation est nécessaire lors des processus d'atrophie et son inhibition pourrait avoir des conséquences délétères sur la récupération. Comme l'inflammation est responsable de l'apparition de l'atrophie, il doit donc exister un fragile équilibre entre les processus pro- et anti-inflammatoires. Chez des rats immobilisés par plâtrage, l'injection de curcumin, connu pour ses propriétés anti-oxydantes et anti-inflammatoires, ne permet pas de diminuer l'atrophie mais améliore la récupération musculaire dans ses phases précoces (Vazeille et coll. 2011).

➢ *Chez des sujets âgés*

Chez la personne âgée, des supplémentations avec 15g d'acides aminés essentiels 3 fois par jours pendant 10 jours d'alitement permettent de limiter la perte de masse

tel-00719700, version 1 - 20 Jul 2012

musculaire (Ferrando et coll. 2010). Sur la base de ces résultats et de ceux obtenus par d'autres études (Paddon-Jones et coll. 2004 ; Cuthbertson et coll. 2005 ; Katsanos et coll. 2005 ; Symons et coll. 2009) ces auteurs concluent que la solution serait d'augmenter la quantité de protéines ingérées pour limiter la perte de muscle chez les patients âgés alités au cours d'une hospitalisation, et donc que leurs Apports Nutritionnels Conseillés devraient être revus à la hausse.

2.2. Au cours de la récupération musculaire

- *Chez des sujets adultes*

La majorité des études se sont focalisées sur les moyens permettant de limiter la perte de masse musculaire au cours de périodes d'immobilisation. Au cours de la période de récupération, le gain protéique passe par la mise en place d'une balance azotée positive. Approvisionner le muscle en acides aminés pourrait ainsi permettre de maintenir une balance azotée positive, et donc de limiter la perte de protéines musculaires et donc de masse. Ainsi, un régime riche en caséines améliore la balance azotée et le contenu en protéines dans les muscles de rats suspendus comparé à des régimes pauvres en protéines (Yokogoshi et coll. 1990). Cependant, la quantité de protéines supplémentaires à donner reste à déterminer. Il faut toutefois garder à l'esprit qu'augmenter de façon très importante la quantité de protéines n'augmente pas proportionnellement la taille et la fonction musculaire chez des sportifs (Tipton & Wolf 2004 ; Tipton & Witard 2007 ; Phillips et coll. 2009).

- *Chez des sujets âgés*

Les quelques études réalisées dans le cadre du vieillissement se sont intéressées à des supplémentations nutritionnelles ayant pour but de préserver la masse musculaire au cours du vieillissement ou au cours de l'immobilisation. A ce jour, aucune étude ne s'est intéressée à des stratégies nutritionnelles au cours de la période de récupération musculaire post-immobilisation chez la personne âgée.

tel-00719700, version 1 - 20 Jul 2012

La plupart des interventions nutritionnelles réalisées dans le cadre de l'inactivité physique ont eu pour but de limiter la perte de muscle entraînée par la décharge musculaire. Ainsi, des supplémentations nutritionnelles ont été réalisées pendant les phases d'immobilisation. A ce jour très peu d'études se sont intéressées aux périodes de récupération musculaire et à l'utilisation d'une nutrition protéique afin de potentialiser l'accrétion protéique au cours de cette phase. A notre connaissance, aucune étude de ce genre n'a été réalisée dans le cadre du vieillissement.

tel-00719700, version 1 - 20 Jul 2012

tel-00719700, version 1 - 20 Jul 2012

OBJECTIFS DE L'ETUDE

& STRATEGIE EXPERIMENTALE

Les données de la littérature montrent des modifications structurales et fonctionnelles du tissu musculaire au cours du vieillissement. Ce phénomène, appelé sarcopénie, est caractérisé par un muscle âgé dont le volume, la masse protéique et les propriétés contractiles sont réduits, en association avec une infiltration lipidique. En outre, des changements de la typologie des fibres musclaires ont été décrits, avec une perte préférentielle des fibres de type II. L'ensemble de ces phénomènes conduit à une diminution de la force, des capacités de contraction et de la performance musculaire chez la personne âgée.

Parmi les nombreux facteurs responsables de la sarcopénie, l'un des facteurs déterminants serait une absence de récupération musculaire à la suite d'épisodes cataboliques (Dardevet et coll. 1995 ; Mosoni et coll. 1999). Ces pertes de masses non récupérées, répétées tout au long de la vie, pourraient résulter en une perte significative de masse musculaire et ainsi participer et/ou aggraver la sarcopénie : il s'agit du « catabolic crisis model » de la sarcopénie (English & Paddon-Jones 2010).

Les périodes d'immobilisation sont courantes au cours du vieillissement, qu'elles résultent d'une réduction générale de l'activité physique, d'un alitement à la suite d'une maladie, d'une hospitalisation etc. Cependant, l'effet de l'inactivité physique en tant que situation génératrice d'atrophie et les périodes de récupération musculaire faisant suite à ces périodes d'inactivité ont été assez peu étudiées chez la personne âgée.

L'objectif de notre travail porte sur l'étude des mécanismes responsables de l'atrophie musculaire induite par une période d'immobilisation au cours du vieillissement, et par la caractérisation de ces mécanismes au cours de la phase de récupération musculaire. Ce travail permet de comprendre l'un des mécanismes impliqués dans l'apparition et/ou l'aggravation de la sarcopénie (succession de pertes de masses non récupérées), et d'envisager des stratégies nutritionnelles afin de limiter ou prévenir cette perte de masse.

Le modèle d'immobilisation utilisé au cours de ce travail est le modèle d'immobilisation par plâtrage. Parmi les différents modèles d'immobilisation décrits dans la littérature, le plâtrage constitue le modèle non pathologique le plus adapté à nos objectifs. En effet, l'immobilisation par plâtrage est « réversible » et permet donc d'étudier les phases d'atrophie musculaire mais également les phases de récupération musculaire, ce qui est impossible dans les modèles d'immobilisation par dénervation. De plus, le plâtrage

tel-00719700, version 1 - 20 Jul 2012

tel-00719700, version 1 - 20 Jul 2012

Figure 39 : Modèle d'immobilisation par plâtrage *(d'après Vazeille et coll. 2008).*

tel-00719700, version 1 - 20 Jul 2012

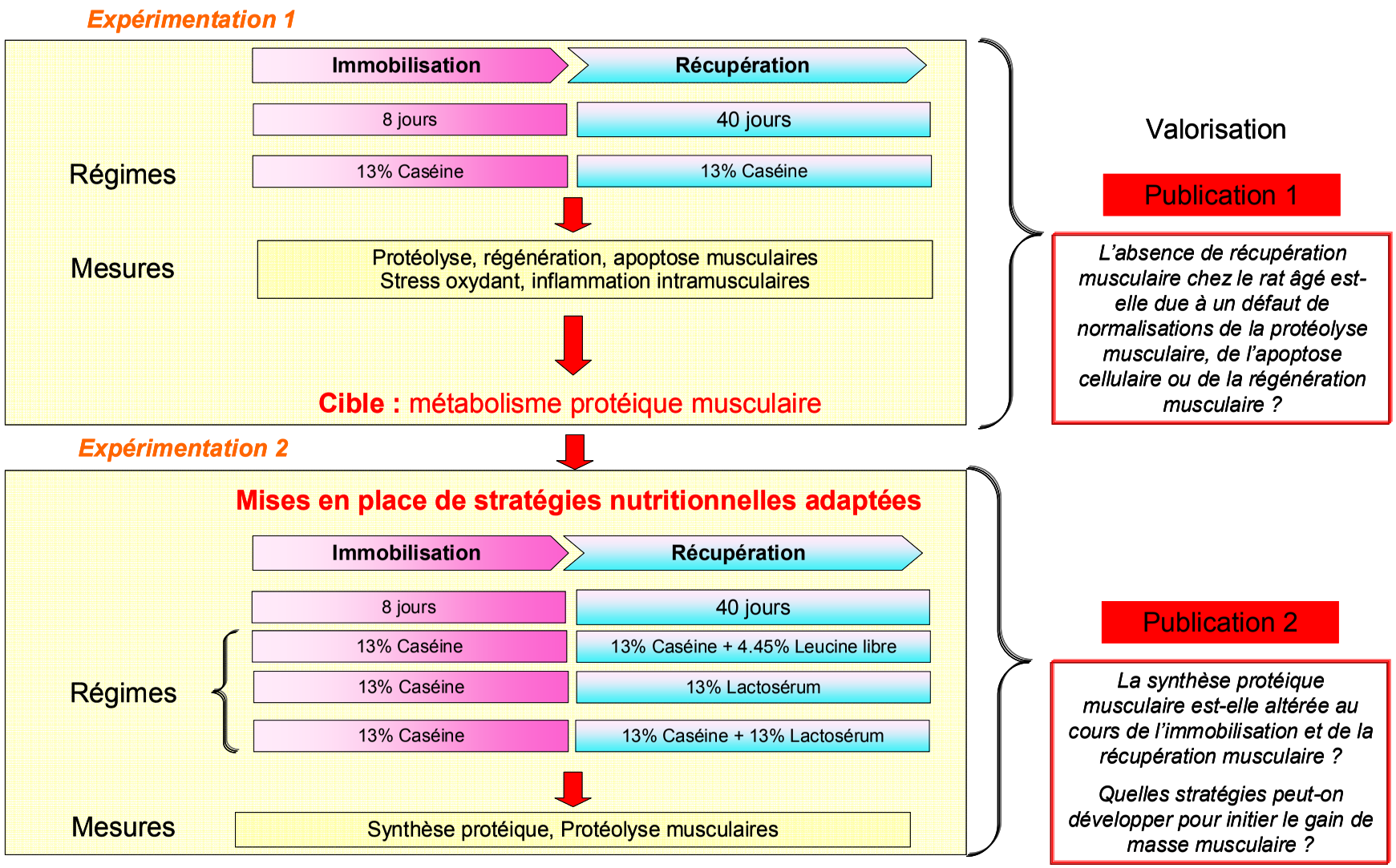


Figure 40 : Schéma récapitulatif du travail des différentes expérimentations

peut être réalisé de façon unilatérale sur l'une des deux pattes arrière (**Figure 39**), ce qui permet à l'animal d'être son propre témoin (Vazeille et coll. 2008), contrairement au modèle d'immobilisation par suspension du train arrière. Enfin, il s'agit du modèle d'inactivité physique le plus proche des situations d'immobilisation rencontrées le plus souvent chez l'homme.

Au cours de l'immobilisation, un ensemble de perturbations biochimiques et métaboliques sont responsables de l'atrophie. Un déséquilibre des balances protéique (synthèse protéique/protéolyse) et cellulaire (régénération musculaire/apoptose) induisent la perte de protéines et de cellules musculaires.

Au cours d'une première expérimentation, nous nous sommes intéressés à la compréhension de ces mécanismes à la suite d'une période d'immobilisation puis au cours de la période de récupération musculaire. L'objectif était de déceler d'éventuelles anomalies de ces différentes voies métaboliques afin de comprendre l'origine des pertes de masses non récupérées. Ce travail a permis de préciser l'impact de l'immobilisation sur la protéolyse, la régénération et l'apoptose dans les muscles de rats âgés immobilisés. Ces mêmes mécanismes étudiés au cours de la récupération ont permis d'expliquer l'absence de récupération musculaire liée à l'âge. Les perspectives de ce travail étaient 1/de préciser l'évolution de la synthèse protéique musculaire au cours de l'immobilisation et de la récupération (puisque notre travail laissait supposer qu'elle était altérée), et 2/ d'utiliser des composés nutritionnels comme levier de stimulation du métabolisme protéique (altéré au cours de l'immobilisation et seulement normalisé au cours de la récupération) afin d'induire un gain de masse musculaire (**Figure 40**).

Une deuxième expérimentation complémentaire de la première nous a permis de mettre en évidence une altération de la synthèse protéique musculaire au cours de l'immobilisation, et sa seule normalisation au cours de la phase de récupération. Nous avons donc tenté de moduler le métabolisme protéique musculaire par l'apport d'acides aminés spécifiques (leucine libre), de protéines particulières (lactosérum) ou de régimes particuliers (régimes hyperprotéinés). Ces différentes stratégies étaient connues pour leur effet anabolique sur le muscle, mais aucune n'avait encore été étudiée au cours de la récupération musculaire au cours du vieillissement (**Figure 40**).

tel-00719700, version 1 - 20 Jul 2012

tel-00719700, version 1 - 20 Jul 2012

PRESENTATION DES TRAVAUX

tel-00719700, version 1 - 20 Jul 2012

Publication 1

Lack of muscle recovery after immobilization in old rats does not result from a deffect in normalization of the ubiquitin-proteasome and the caspase-dependent apoptotic pathways

H. Magne, I. Savary-Auzeloux, E. Vazeillle, A. Claustre, D. Attaix, A. Listrat, V. Santé-Lhoutellier, P. Gatellier, D. Dardevet & L. Combaret

J Physiol 589.3 (2011) pp 511-524

tel-00719700, version 1 - 20 Jul 2012

Introduction :

Le vieillissement s'accompagne d'une perte de masse musculaire appelée sarcopénie. Cette atrophie est responsable d'une fragilisation de la personne âgée, entraînant une perte de mobilité, une augmentation de la probabilité de survenue d'infections, ainsi qu'une moindre capacité de récupération suite à des évènements délétères. La sarcopénie est un phénomène multifactoriel. Parmi les nombreux facteurs participant à la mise en place de cette atrophie, l'un des facteurs déterminant serait une absence de récupération musculaire à la suite d'épisodes cataboliques (Dardevet et coll. 1995 ; Mosoni et coll. 1999). La succession de ces pertes de masses non récupérées tout au long de la vie pourrait résulter en une perte significative de masse musculaire et ainsi participer et/ou aggraver la sarcopénie (English & Paddon-Jones 2010). Bien que les périodes d'immobilisation soient courantes au cours du vieillissement (réduction générale de l'activité physique, alitement à la suite d'une maladie, hospitalisation etc.), l'effet de l'inactivité physique en tant que situation génératrice d'atrophie chez la personne âgée et les périodes de récupération musculaires faisant suite à ces périodes d'inactivité ont été assez peu étudiées. Seules deux études ont mis en évidence une absence de récupération chez l'animal (Chakravarthy et coll. 2000) et l'homme âgés (Suetta et coll. 2009) immobilisées sans en faire la cause d'apparition de la sarcopénie.

Cette perte de masse musculaire implique forcément un déséquilibre de la balance cellulaire (équilibre entre les processus d'apoptose et de régénération/différenciation cellulaire) et de la balance protéique (équilibre entre la synthèse et la dégradation des protéines). La protéolyse ubiquitine-protéasome-dépendante est responsable de la dégradation des protéines contractiles majeures. Cette voie est activée au cours de l'immobilisation et normalisée rapidement au cours des périodes de récupération chez des animaux adultes (Taillandier et coll. 1996, Vazeille et coll. 2008). Ce système semble fortement dérégulé au cours du vieillissement (Dardevet et coll. 1995 ; Combaret et coll. 2005). Or, l'arrêt des situations d'atrophie nécessite la normalisation de ce système (afin d'équilibrer la balance azotée) et à priori la récupération de masse musculaire nécessite une régulation négative de cette voie (afin de positiver la balance azotée). Ce système pourrait donc être en partie responsable du défaut de récupération musculaire observé à la suite d'épisodes cataboliques au cours du vieillissement. La balance cellulaire pourrait être fortement déséquilibrée au cours de ces situations. Ainsi, une augmentation importante de l'apoptose des cellules musculaires chez des animaux âgés immobilisés (Alway et coll.

2003 ; Plant et coll. 2009) associée à une diminution importante de la capacité de régénération cellulaire au cours du vieillissement pourraient résulter en une perte de cellules importante au cours de ces situations d'atrophie. L'objectif de cette étude est de caractériser les processus ubiquitine-protéasome-dépendant, apoptotique et de régénération cellulaire au cours d'une courte période d'immobilisation et de vérifier si une absence de normalisation de ceux-ci au cours des phases de récupération musculaire pourrait expliquer le défaut de gain de masse qui a été observé.

Méthodes :

L'expérience a été réalisée chez des rats âgés de 22-24 mois. Les animaux ont d'abord été immobilisés par plâtrage unilatéral d'une patte arrière pendant 8 jours, puis déplâtrés afin d'initier la phase de récupération musculaire pendant 10, 20 et 40 jours. Pendant toute l'expérience les animaux ont été nourris avec un régime contenant 13% de caséine. En parallèle, des animaux non plâtrés, *pair fed* des animaux immobilisés ont été étudiés à tous les temps. Les principales activités du protéasome (activités chymotrypsin- et trypsin-like) ainsi que l'activité de l'apoptosome, des caspases-3 et -8 ont été mesurées. La quantité de protéines poly-ubiquitinées, de protéines pro-apoptotique Smac/DIABLO et anti-apoptotique XIAP, ainsi que du facteur de régénération musculaire myf-5 ont été évaluées par western-blot. Une mesure du nombre de noyaux apoptotiques a été réalisée après les 8 jours d'immobilisation. Enfin, des marqueurs intramusculaires du stress oxydant (protéines carbonylées, TBARS) et de l'inflammation (MCP-1, gluthation) ont été mesurés à tous les temps.

Principaux résultats :

Au terme des 8 jours d'immobilisation, les muscles *gastrocnemius* immobilisés étaient atrophiés de 21% comparativement à des muscles non immobilsés. A 40 jours post-déplâtrage, aucune récupération musculaire n'a été enregistrée. De plus et de façon surprenante, une atrophie de la patte controlatérale non plâtrée est apparue 20 jours après le déplâtrage de l'autre patte. Si les voies protéolytique ubiquitine-protéasome-dépendante et l'apoptose mitochondriale étaient bien activées par le plâtrage, la régénération/différenciation cellulaire était fortement inhibée, ceci pouvant expliquer la génération de l'atrophie musculaire. Cependant, tous ces processus sont seulement

tel-00719700, version 1 - 20 Jul 2012

normalisés dès 10 jours de récupération, permettant ainsi d'expliquer l'absence de récupération de la masse musculaire post-déplâtrage. Ainsi, aucune régulation négative de ces voies, c'est-à-dire une inhibition en-dessous de leurs valeurs basales, n'est observée au cours de la récupération. Nous avons aussi pu observer que la phase de récupération était associée à l'apparition d'un stress oxydant qui pourrait en être en partie responsable d'une moindre stimulation de la synthèse protéique au cours de la phase de récupération musuclaire. Ceci reste cependant à démontrer par des mesures de protéosynthèse musculaire au cours de l'immobilisation et de la récupération musculaire.

Conclusion :

L'immobilisation par plâtrage chez le rat âgé induit une perte de masse musculaire locale (dans la patte immobilisée) qui n'est pas récupérée même 40 jours après déplâtrage, mais aussi une perte de masse musculaire généralisée (dans la patte non immobilisée, après le déplâtrage). Ces phénomènes peuvent contribuer à l'apparition de la sarcopénie. L'atrophie musculaire induite par le plâtrage peut être expliquée par une augmentation du système ubiquitine-protéasome-dépendante et de l'apoptose mitochondriale ainsi qu'une diminution des processus de régénération/différenciation cellulaire. Cependant, l'absence de récupération musculaire n'est pas due à un défaut de normalisation de ces voies. Nos données laissent donc supposer que la synthèse protéique musculaire serait fortement affectée par l'immobilisation et pourrait faire défaut lors de la phase de récupération musculaire, entrainant une absence de gain de masse musculaire.

tel-00719700, version 1 - 20 Jul 2012

tel-00719700, version 1 - 20 Jul 2012

The Journal of Physiology

Lack of muscle recovery after immobilization in old rats does not result from a defect in normalization of the ubiquitin–proteasome and the caspase-dependent apoptotic pathways

Hugues Magne[1], Isabelle Savary-Auzeloux[1], Emilie Vazeille[1], Agnès Claustre[1], Didier Attaix[1], Listrat Anne[2], Santé-Lhoutellier Véronique[3], Gatellier Philippe[3], Dominique Dardevet[1*] and Lydie Combaret[1*]

[1]INRA, UMR 1019 Unité de Nutrition Humaine, 63122 Saint Genès Champanelle, France, and Clermont Université, UFR Médecine, UMR 1019 Nutrition Humaine, 63000 Clermont-Ferrand, France
[2]INRA, UR 1213, Unité de Recherche sur les Herbivores, 63122 Saint Genès Champanelle, France
[3]INRA, UR 370, Qualité des Produits Animaux, 63122 Saint Genès Champanelle, France

Non-technical summary Immobilization periods increase with age because of decreased mobility and/or because of increased pathological episodes that require bed-rest. Then, sarcopaenia might be partially explained by an impaired recovery of skeletal muscle mass after a catabolic state due to an imbalance of muscle protein metabolism, apoptosis and cellular regeneration. Mechanisms involved during muscle recovery have been little studied and in elderly they remain almost unknown. We show, in rats, that a short immobilization period during ageing initiated muscle atrophy that was indeed not recovered after 40 days. Immobilization was associated with an activation of both the ubiquitin–proteasome and the mitochondria-associated apoptotic pathways and the inflammatory and redox processes, and a decrease of cellular regeneration. We show that the lack of muscle recovery during ageing is not due to a defect in proteolysis or apoptosis down-regulation. These observations lead us to hypothesize that muscle protein synthesis activation after immobilization was altered during ageing.

Abstract Immobilization periods increase with age because of decreased mobility and/or increased pathological episodes that require bed-rest. Sarcopaenia might be partially explained by an impaired recovery of skeletal muscle mass after a catabolic state due to an imbalance of muscle protein metabolism, apoptosis and cellular regeneration. Mechanisms involved in muscle recovery have been poorly investigated, and remain almost unknown in the elderly. This study aimed at studying the regulation of the capsase-dependent apoptotic and the ubiquitin–proteasome-dependent proteolytic pathways during immobilization and subsequent recovery during ageing. Old rats (22–24-months old) were subjected to unilateral hindlimb casting for 8 days (I8) and allowed to recover for 10 to 40 days (R10 to R40). Immobilized gastrocnemius muscles atrophied by 21%, and did not recover even at R40. Apoptotic index, amount of polyubiquitinated conjugates, proteasome chymotrypsin- and trypsin-like, apoptosome-linked caspase-9, -3, and -8 activities increased at I8. Conversely, the amount of the myogenic factor myf-5 decreased at I8. These changes paralleled the increase of intramuscular inflammation and oxidative stress. All these parameters normalized as soon as R10. The XIAP/Smac-DIABLO protein ratio decreased by half in immobilized muscles and remained low during recovery. Surprisingly, the non-immobilized leg also atrophied from R20, concomitantly with a decreased XIAP/Smac-DIABLO protein ratio. Altogether, this suggests that the impaired recovery following immobilization in ageing does not result from a lack of normalization of the caspase-dependent

*Both authors contributed equally to this work.

© 2011 The Authors Journal compilation © 2011 The Physiological Society

DOI: 10.1113/jphysiol.2010.201707

apoptotic and the ubiquitin–proteasome-dependent pathways, and also that immobilization could induce a general muscle loss and then contribute to the development of sarcopaenia in elderly.

(Resubmitted 28 October 2010; accepted after revision 26 November 2010; first published online 29 November 2010)
Corresponding author H. Magne: INRA, UMR 1019 Unité de Nutrition Humaine, 63122 Saint Genès Champanelle, France. Email: hugues.magne@clermont.inra.fr

Abbreviations: I, immobilized; MCP-1, monocyte chemotactic protein-1; NI, non-immobilized; PF, pair-fed; Smac/DIABLO, second mitochondria-derived activator of caspase; TBARS, thiobarbituric acid reactive substances; Ub, ubiquitin; UPS, ubiquitin–by-proteasome-dependent proteolysis; XIAP, X-linked inhibitory apoptotic protein.

Introduction

Normal ageing is associated with a progressive loss of muscle mass and strength, a condition known as sarcopaenia (Rosenberg, 1989). This phenomenon is inevitable and has also been reported among healthy people and physically active elderly subjects (Hughes et al. 2001). Skeletal muscle is the major reservoir of body proteins and amino acids that can be used to cope with nutritional, infectious or traumatic stress. Therefore, sarcopaenia is a highly predictive factor of frailty, of limited mobility, of increased susceptibility to injury and of impaired recovery (Evans, 1997; Harris, 1997).

Many mechanisms have been proposed to explain sarcopaenia. Skeletal muscle is clearly resistant to anabolic stimuli such as food intake during ageing (for review see Balage & Dardevet, 2010), and impaired recovery of skeletal muscle mass has also been observed after an acute catabolic state (Dardevet et al. 1995; Mosoni et al. 1999). The succession of catabolic periods followed by incomplete recoveries results in a significant muscle mass loss over time and has been named recently 'the catabolic crisis model' (English & Paddon-Jones, 2010). An increase of prolonged periods of immobilization as a consequence of weakness, hospitalization or bed-rest is commonly associated with these catabolic states. However, the effect of disuse by itself on skeletal muscle in elderly individuals has not been extensively investigated and the subsequent recovery ability has been even less studied despite the fact that an impaired recovery prevailed in old rats (Chakravarthy et al. 2000) and elderly humans (Suetta et al. 2009) after immobilization-induced muscle atrophy. This impaired recovery has been linked only to decreased muscle strength and neuronal motor function (Suetta et al. 2009).

Knowledge of the cellular and molecular mechanisms underlying this lack of recovery is limited during ageing, but they have been related only to a decline in the pathways regulating the activation of muscle satellite cells during muscle regrowth (Zarzhevsky et al. 2001; Conboy et al. 2003). Beside this impaired regenerative process, an increased apoptosis could also contribute to the loss of myocytes. This suggests an imbalance between regeneration and apoptotic processes following immobilization in old muscles. In addition, changes in skeletal muscle protein mass depend on the overall balance between rates of protein synthesis and breakdown. Muscle recovery after immobilization results not only from a normalization of changes in muscle protein metabolism but also from increased protein synthesis, decreased proteolysis, or simultaneous changes in both processes. To our knowledge, and surprisingly, these aspects (i.e. apoptosis and muscle protein metabolism) have not been assessed during the recovery period following immobilization in ageing.

Ubiquitin–proteasome-dependent proteolysis (UPS) is responsible for the breakdown of the major contractile proteins (Attaix et al. 2005). In this pathway, substrates are tagged by covalent attachment of multiple ubiquitins and then recognized and degraded by the 26S proteasome. We and others have demonstrated that the ubiquitin pathway is highly activated during disuse atrophy in adult rats (Wing et al. 1995; Taillandier et al. 1996; Ikemoto et al. 2001; Vazeille et al. 2008), and rapidly normalizes during the recovery period as is the activation of apoptosis (Vazeille et al. 2008). However, during ageing, we have shown that muscle proteolysis becomes less sensitive to anabolic or catabolic stimuli (Dardevet et al. 1995; Mosoni et al. 1999; Combaret et al. 2005). This deregulation of the UPS may in part account for the lack of recovery of skeletal muscle mass following catabolic states.

Two main apoptotic pathways have been involved in caspase activation. The extrinsic pathway is triggered by the activation of a family of death receptors (e.g. TNFR) at the cell surface and controls the activation of caspase-8. In the intrinsic pathway (also called the mitochondria-associated apoptotic pathway), the mitochondria releases cytochrome c, which associates in the cytoplasm with Apaf-1 and caspase-9 to form the apoptosome (Adhihetty & Hood, 2003). This complex further activates caspase-3, a key cell death protease

© 2011 The Authors. Journal compilation © 2011 The Physiological Society

tel-00719700, version 1 - 20 Jul 2012

that initiates DNA fragmentation (Kujawa et al. 2005; Dupont-Versteegden, 2005). Both apoptotic pathways are believed to be physiologically important in sarcopaenia (Dirks & Leeuwenburgh, 2004; Pistilli et al. 2006; Marzetti et al. 2009), and in regulating disuse-induced muscle atrophy both in younger adult (Andrianjafiniony et al. 2010) and in old (Alway et al. 2003; Plant et al. 2009) animals. The mitochondria-associated apoptotic pathway was concomitantly activated with the UPS during immobilization-induced atrophy (Vazeille et al. 2008) and was normalized during recovery (Vazeille et al. 2008; Andrianjafiniony et al. 2010), whereas the death receptor-mediated apoptotic pathway promoting the activation of caspase-8 remained elevated during recovery following unloading in adult rats (Andrianjafiniony et al. 2010). This study tested whether this impaired recovery during reloading in ageing results from a lack of normalization of the UPS and/or the caspase-dependent apoptotic pathways.

Methods

Animals and experimental design

All procedures were performed in accordance with institutional guidelines on animal experimentation in France and comply with the policies and regulations of The Journal of Physiology given by Drummond (2009). Male Wistar rats aged 22–24 months were housed individually under controlled environmental conditions (room temperature 22°C; 12 h light–dark cycle, light period starting at 08.00 h), fed ad libitum a basal diet, and given free access to water. Basal diet was composed of (in g kg^{-1} diet): 152.2 casein, 1.8 L-cystine, 30 colza oil, 3 sunflower oil, 27 peanut oil, 35 cellulose, 35 AIN93 mineral mix, 10 AIN93 vitamin mix, 2.5 cholin, 100 saccharose, 134.5 lactose and 469 wheat flour.

After a 3 week adaptation period, 42 rats were anaesthetized with isoflurane inhalation and subjected to unilateral hindlimb cast immobilization with an Orfit-soft plaque (Gibaud, Saint Etienne, France) for 8 days (I8). The foot was positioned in plantar extension to induce maximal atrophy of the gastrocnemius muscles (Goldspink, 1977). Casted rats reduced their food intake during the immobilization period. Therefore, 35 control non-casted rats were pair-fed (PF) to the casted group. For muscle recovery studies, casts were removed and animals were allowed to recover for 10 (R10), 20 (R20) or 40 (R40) days. Eight rats were studied as control before the immobilization period (I0). At each time point animals were killed under pentobarbital sodium anaesthesia (50 mg kg^{-1} I.P.). Hindlimb gastrocnemius muscles were carefully dissected, weighed and frozen in liquid nitrogen. The central part of gastrocnemius samples was frozen in isopentane chilled at –196°C by liquid nitrogen for apoptotic nuclei measurements.

Apoptotic nuclei measurements

Frozen sections of gastrocnemius muscles were cut into 10 µm-thick cross sections with a cryostat (Cryo-star HM560MV, Microm International, Walldorf, Germany). The DNA fragmentation of nuclei was monitored using a TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase biotin-dUTP nick-end labelling) fluorescence detection kit according to the manufacturer's instructions (Roche Applied Science, Indianapolis, IN, USA). This corresponds to global nuclear apoptosis measurements with evaluation of total nuclei contained in muscle.

Measurement of proteasome and apoptosome activities

Gastrocnemius muscle powder (150 mg) from pair-fed (PF), non-immobilized (NI) and immobilized (I) muscles at each time point were homogenized in 10 volumes of an ice-cold buffer containing 50 mM Tris-Cl (pH 7.5), 5 mM $MgCl_2$, 250 mM sucrose, 1 mM dithiothreitol (DTT), 10 mM adenosine triphosphate (ATP) and protease inhibitors (10 µg ml^{-1} antipain, 10 µg ml^{-1} leupeptin, 10 µg ml^{-1} aprotinin, 10 µg ml^{-1} pepstatin A, 20 µM phenylmethanesulphonyl fluoride (PMSF)). Apoptosome complexes co-sediment with proteasomes (Cain et al. 1999) and the apoptosome linked caspase-9 activity co-elutes with peptidase activities of the proteasome on 10–40% sucrose gradients (Cain et al. 1999; Vazeille et al. 2008). Apoptosome complexes and proteasomes were therefore isolated by three sequential centrifugations as described previously (Fang et al. 2000). Briefly, extracts were centrifuged at 10,000 g for 20 min at 4°C. Supernatants were then centrifuged at 100,000 g for 1 h at 4°C and resulting supernatants were finally centrifuged at 100,000 g for 5 h at 4°C. The resulting protein pellets were resuspended in 150 µl of a buffer containing 20% glycerol, 5 mM $MgCl_2$ and 50 mM Tris-Cl (pH 7.5) (Buffer A). Protein concentration was determined on these resuspended pellets according to Lowry et al. (1951). The proteasome chymotrypsin- and trypsin-like activities and the apoptosome-linked caspase-9 activity were determined by measuring the hydrolysis of the fluorogenic substrates succinyl-Leu-Leu-Val-Tyr-7-amino-4-methylcoumarin (LLVY-AMC) (Sigma, St. Louis, MO, USA), Boc-Leu-Arg-Arg-7-amino-4-methylcoumarin (LRR-AMC) (Enzo Life Sciences, Farmingdale, NY, USA) and N-acetyl-Leu-Glu-His-Asp-7-amino-4-methylcoumarin (LEHD-AMC) (Biomol, Hamburg, Germany), respectively.

To measure the proteasome chymotrypsin- and trypsin-like activities, 15 µg of proteins from the resuspended pellets diluted in 15 µl of Buffer A were

© 2011 The Authors Journal compilation © 2011 The Physiological Society

tel-00719700, version 1 - 20 Jul 2012

added to 60 µl of reaction buffer (50 mM Tris-Cl (pH 7.5), 11.25 mM $MgCl_2$, 1.25 mM DTT, 0.01 U apyrase) containing either 300 µM LLVY-AMC or 800 µM LRR-AMC. To measure the apoptosome-linked caspase-9 activity, 25 µl of the resuspended pellets was diluted to 50 µl in buffer A and then incubated with 50 µl of a reaction buffer (100 mM Pipes, pH 6.5, 0.2 mM EDTA, 10 mM DTT) containing 100 µM LEHD-AMC (Biomol, Hamburg, Germany). Pilot experiments were performed with or without inhibitors of chymotrypsin-like (40 µM MG132, AFFINITI Research Products Ltd, Exeter, UK), trypsin-like (100 µM lactacystin, Sigma, St. Louis, MO, USA), or caspase-9 (LEHD-CHO, Biomol, Hamburg, Germany) activities to ensure that they were totally inhibited.

Activities were determined by measuring the accumulation of the fluorogenic cleavage product (amino-4-methylcoumarin, AMC) using a luminescence spectrometer (FLX 800, Biotek, Winooski, VT, USA) during 45 min at 380 nm excitation wavelength and 440 nm emission wavelength. For the apoptosome-linked caspase-9 activity, final data were corrected by the amount of protein. The time course for the accumulation of AMC after hydrolysis of the substrate was analysed by linear regression to calculate activities, i.e. the slopes of best fit of accumulation AMC vs. time.

Caspase-3 and caspase-8 activity measurements

Caspase-3 and caspase-8 activities were assessed in total cytosolic protein extracts. Powder (200 mg) of gastrocnemius muscles was homogenized in 3.75 volumes of a buffer containing 10 mM NaCl, 1.5 mM $MgCl_2$, 20 mM Hepes, 20% glycerol, 0.10% Triton X-100 and 1 mM DTT (Buffer B). Extracts were centrifuged at 1500 g for 5 min at 4°C and the resulting supernatants were subjected to three further centrifugations at 3500 g for 5 min at 4°C. The last supernatants were stored as total cytosolic protein extracts at −80°C. A protease inhibitor cocktail containing 104 mM 4-(2-aminoethyl)benzenesulfonylfluoride hydrochloride (AEBSF), 0.08 mM aprotinin, 2 mM leupeptin, 4 mM bestatin, 1.5 mM pepstatin A and 14 mM E-64 (Sigma, St. Louis, MO, USA) was added to a small part of these supernatants, which were then stored at −80°C for subsequent determination of protein levels for the X-linked inhibitory apoptotic protein (XIAP) and the second mitochondria-derived activator of caspase (Smac/DIABLO) (see below). Protein concentration was determined according to Lowry et al. (1951).

Caspase-3 and caspase-8 activities were assessed using the fluorogenic substrates, Ac-Asp-Glu-Val-Asp-AMC (DEVD-AMC, Calbiochem, Darmstadt, Germany) and N-acetyl-Ile-Glu-Thr-Asp-AMC (Ac-IETD-AMC, Sigma, St. Louis, MO, USA), respectively. Twenty-five microlitres of the total cytosolic protein extracts was diluted to 50 µl in Buffer B (see above) and incubated with 50 µl of a medium containing 100 mM Pipes (pH 6.5), 0.2 mM EDTA, 10 mM DTT, 20% glycerol and 100 µM DEVD-AMC. Pilot experiments were performed with or without inhibitor of caspase-3 (Ac-Asp-Met-Gln-Asp-CHO, DMQD-CHO, Calbiochem, Darmstadt, Germany) or caspase-8 (Ac-IETD-CHO, Sigma, St. Louis, MO, USA) to ensure that the activity was totally inhibited. Accumulation of the fluorogenic cleavage product AMC was followed using a luminescence spectrometer (FLX 800, Biotek, Winooski, VT, USA) (as described above) and the final data were corrected by the amount of protein.

Muscle XIAP, Smac/DIABLO, ubiquitin(Ub)-conjugated and myf-5 protein contents

Sixty micrograms of total protein extract was separated on 7.5% and 12% acrylamide gels for XIAP and Smac/DIABLO, respectively, and then transferred on polyvinylidene fluoride (PVDF) membranes (GE Healthcare, Orsay, France). Antibodies against XIAP and Smac/DIABLO (Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA) were used at 1:1000 and at 1:4000 dilutions respectively.

The accumulation of poly(Ub)conjugates was assessed on myofibrillar protein extracts. Powder (150 µg) of gastrocnemius muscles was homogenized in an ice-cold buffer containing 5 mM Tris-HCl (pH 7.5), 5 mM EDTA (pH 8.0), 1 mM PMSF, 5 mM N-ethyl-maleimide (NEM), 5 µg ml^{-1} leupeptin (Buffer C). Homogenates were centrifuged for 5 min (1500 g, 4°C) to pellet myofibrillar proteins, which were then washed three times in Buffer C containing 1% Triton X-100. Myofibrillar proteins were then resuspended in 8 M urea/5 mM Tris-HCl (pH 7.5). Protein concentrations were determined as described above. Twenty-five micrograms of myofibrillar proteins was separated on 7.5% acrylamide gels and transferred onto PVDF membranes (GE Healthcare, Orsay, France) to measure the accumulation of Ub-conjugates using the FK1 antibody, which recognizes poly-Ub chains (Millipore, Billerica, MA, USA) at 1:1,000 dilution.

The abundance of myf-5 was assessed on an aliquot of the supernatant obtained after the second 100,000 g centrifugation performed for proteasome and apoptosome extraction (see above). Protein concentration was determined as described previously. Fifty micrograms of total protein extract was separated on a 12% acrylamide gel and transferred on PVDF membranes (GE Healthcare, Orsay, France). Antibody against myf-5 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA) was used at 1:1000 dilution. On each gel a reference sample (composed of a pool of samples) was systematically analysed and then used to compare the different gels.

© 2011 The Authors. Journal compilation © 2011 The Physiological Society

tel-00719700, version 1 - 20 Jul 2012

Signals were detected using the ECL+ detection kit (GE Healthcare, Orsay, France) after exposition onto radiographic film (Hyperfilm ECL, GE Healthcare, Orsay, France), quantified by densitometry using the ImageJ software and normalized against the signal obtained with the reference sample.

Intramuscular oxidative stress and inflammatory marker measurements

All measurements described below were performed on gastrocnemius muscle powder. Oxidative stress was evaluated by measuring the content of intramuscular total glutathione and of oxidized proteins and lipids. Briefly, for total glutathione measurement, powder was homogenized in a solution containing 20% perchloric acid and 5 mM EDTA. The homogenate was then centrifuged for 15 min at 14,000 g, and the supernatant was assayed for total glutathione content using a standard enzymatic assay described by Robinson et al. (1992). To assess protein oxidation, the carbonyl groups were detected by their reactivity with 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) to form hydrazone derivates, using the spectrophotometric method described by Oliver et al. (1987) and slightly modified by Mercier et al. (1998). The results were expressed as nanomoles of DNPH fixed per milligram of protein. Lipid oxidation was evaluated by the thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) method according to Lynch & Frei (1993) and modified by Mercier et al. (1998). This method involves the breakdown of lipid peroxides into malondialdehyde (MDA) molecules. MDA reacts subsequently with the thiobarbituric acid (TBA), producing compounds suitable for spectrophotometric detection. The results were expressed as milligrams of MDA per kilogram of muscle.

Inflammatory status was evaluated by measuring muscle content of MCP-1, a cytokine recruiting inflammatory cells. MCP-1 was detected with an ELISA kit (RayBio Rat MCP-1 ELISA, RayBiotech, Inc., Norcross, GA, USA) which uses an antibody specific for rat MCP-1. This assay was performed according to the manufacturer's instructions. The results were expressed as nanograms of MCP-1 per milligram of muscle.

Statistical analyses

All data are expressed as means ± SEM. for n = 8 (I0), n = 15 (I8 PF), n = 16 (I8), n = 5 (R10PF), n = 8 (R10), n = 7 (R20PF), n = 9 (R20) n = 8 (R40PF) and n = 9 (R40). Food intake and body weight comparisons were performed using repeated measures analysis of variance test (StatView statistical software package, version 5, SAS Institute, Cary, NC, USA). For other measurements, the effects of time (I8 to R40) and group (PF, NI or I) were analysed using a two-way ANOVA. When significant differences were detected, post hoc comparisons between groups were made using the Fisher's PLSD test. Significance was defined at the $P < 0.05$ level.

Results

Animal characteristics

Before the immobilization period, food intake was 21.3 ± 0.28 g day^{-1} (I0). Casted rats reduced their food intake by 62% (Fig. 1A) on the first day of immobilization (8.1 ± 0.47 g day^{-1}). Then animals increased their food intake up to 13.4 ± 0.28 g day^{-1} at I8 and progressively reached initial values (20.3 ± 0.04 g day^{-1} at R40) after cast removal. Food intake of the pair-fed group perfectly matched the one of the casted group during immobilization (8.0 ± 0.22 g day^{-1} at I8) and subsequent recovery.

Casted rats exhibited a slight decrease of body weight during immobilization (−9.6% at I8), which worsened during the recovery period and reached 13.4% and 16.9% at R10 and R20, respectively (Fig. 1B). During the same

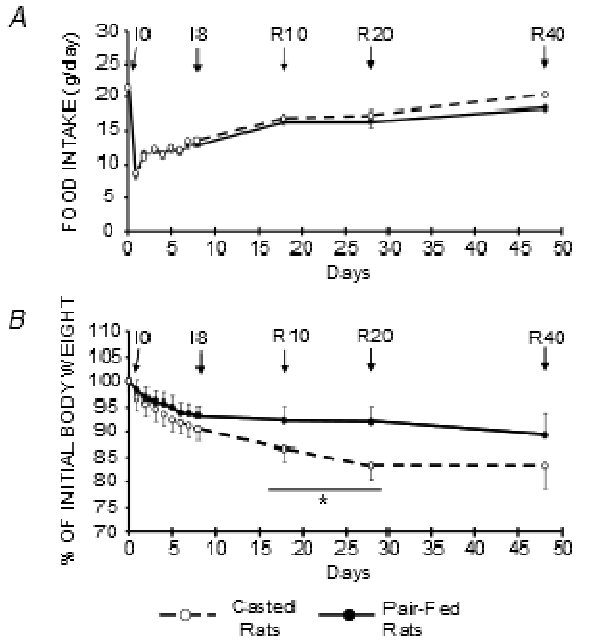


Figure 1. Food intake (A) and body weight (B) of non casted pair-fed (PF) and casted rats during immobilization and subsequent recovery

Food intake is similar between casted and PF animals during the whole experiment, whereas body weight of casted rats significantly decreased compared to PF rats from R10. I0: before immobilization; I8: 8 days of casting; R10 to R40: 10 to 40 days of recovery. Food intake is expressed in g day^{-1} and body weight is expressed as a percentage of initial body weight. *$P < 0.05$ using repeated measures analysis of variance test, casted rats vs. PF. Data are means ± SEM.

© 2011 The Authors. Journal compilation © 2011 The Physiological Society

tel-00719700, version 1 - 20 Jul 2012

Table 1. Effect of casting on gastrocnemius muscle mass before and during immobilization and recovery

Time	Non-casted rats		
I0	2.643 ± 0.042[a]		
	Non-casted pair fed rats	Casted rats	
		Immobilized leg	Non immobilized leg
I8	2.611 ± 0.049[a]	2.059 ± 0.081[b]	2.606 ± 0.084[a]
R10	2.619 ± 0.045[a]	2.086 ± 0.094[b]	2.579 ± 0.050[a]
R20	2.605 ± 0.048[a]	2.048 ± 0.052[b]	2.303 ± 0.079[c]
R40	2.583 ± 0.032[a]	2.185 ± 0.078[b]	2.407 ± 0.062[c]

I0: before casting; I8: 8 days of casting; R10 to R40: 10 to 40 days of recovery. Muscle mass is expressed in grams. The muscle mass change from I0 to R40 was assessed using a two-way ANOVA (time, group); values with different letters are significantly different from each other ($P < 0.05$). When significant differences were detected, post hoc comparisons between groups were made using Fisher's PLSD test. Data are means ± S.E.M.

period, the body weight of pair-fed animals decreased only by 6.8% at I8 and remained constant during recovery (~−8% at R10 and R20).

Skeletal muscle mass during immobilization and recovery

Gastrocnemius muscle masses from pair-fed rats were stable during the whole experiment (2.583 ± 0.032 g at R40 vs. 2.643 ± 0.042 g at I0) (Table 1). Immobilized gastrocnemius muscles atrophied at I8 by 21% (Table 1, $P < 0.0005$; I leg vs. NI leg or vs. PF group). After cast removal, gastrocnemius muscles from the I leg did not recover at all even at R40 (2.185 ± 0.078 g) (Table 1). More surprisingly, gastrocnemius muscle masses from the NI leg remained constant between I8 (2.606 ± 0.084 g) and R10 (2.579 ± 0.050 g), but then decreased down to 2.303 ± 0.079 g and 2.407 ± 0.062 g at R20 and R40, respectively (Table 1, $P < 0.05$; NI leg vs. PF group).

Regulation of ubiquitin–proteasome-dependent pathway

This pathway involves two distinct steps, i.e. the ubiquitination of proteins and their subsequent degradation by the 26 S proteasome. We have investigated both steps by measuring (i) the accumulation of poly(Ub) conjugates, which are the final products of the ubiquitination step, and (ii) the chymotrypsin- and the trypsin-like activity of the proteasome.

Figure 2 shows that neither poly(Ub) conjugates nor chymotrypsin- and trypsin-like activities of the proteasome changed in muscles from the PF group or the NI leg of the casted rats throughout the whole experiment.

The amount of poly(Ub) conjugates increased at I8 in gastrocnemius muscle from the I leg of the casted rats compared to muscles from the NI leg or from the PF group of rats (+30% and +53%, respectively, $P < 0.05$) (Fig. 2A). Accordingly, the proteasome chymotrypsin- and trypsin-like activity also increased in I muscles at I8 by 29 or 33% ($P < 0.05$, vs. NI or PF group) and by 32% or 38% ($P < 0.05$, vs. NI or PF group) (Fig. 2B). Both increased poly(Ub) conjugates levels and chymotrypsin- and trypsin-like activities of the proteasome were normalized at R10 in muscles from the I leg compared to muscles from the NI leg or the PF group (Fig. 2A and B).

Regulation of the caspase-dependent apoptotic pathway

We and others have reported that disuse-induced muscle atrophy in adults was associated with increased Smac/DIABLO, decreased XIAP protein levels, and increased caspase-3 activity (Vazeille et al. 2008; Siu & Alway, 2005), suggesting the activation of the mitochondria-associated apoptotic pathway. Furthermore, this pathway is down-regulated in muscles during recovery in adults (Vazeille et al. 2008; Andrianjafiniony et al. 2010). In addition, these alterations in the ratio of XIAP to Smac/DIABLO protein levels also prevailed in unloaded muscles from old birds (Siu et al. 2005b). Finally, disuse-induced muscle atrophy was also associated with increased caspase-8 activity in younger adult (Ferreira et al. 2008; Andrianjafiniony et al. 2010),

© 2011 The Authors. Journal compilation © 2011 The Physiological Society

tel-00719700, version 1 - 20 Jul 2012

and in old animals (Alway et al. 2003), suggesting that the death receptor-mediated apoptotic pathway is also activated. This pathway remained elevated during recovery in suspended rats (Andrianjafiniony et al. 2010). We therefore addressed the regulation of these two apoptotic pathways by measuring (i) the ratio between XIAP and Smac/DIABLO protein levels, (ii) the apoptosome-linked caspase-9 activity, and (iii) the caspase-3 and -8 activities.

Figure 3 shows the amount of the pro- and the anti-apoptotic proteins XIAP and Smac/DIABLO. Levels of both proteins remained unchanged in muscles from the PF group during immobilization and recovery. XIAP protein levels tend to increase in the NI leg of the casted rats at R10 (+22% vs. PF, NS), and returned to basal levels at R20 and R40 (Fig. 3A). Smac/DIABLO protein levels were stable between I8 and R10 in the NI leg, but then progressively tend to increase from R20 (+23% vs. PF, NS) to R40 (+48% vs. PF, NS) (Fig. 3B). Consequently, the ratio of XIAP to Smac/DIABLO progressively decreased in muscles from the NI leg compared to the PF value from R10 to R40 (Fig. 3C). XIAP protein levels decreased by ~23% (Fig. 3A), while Smac/DIABLO protein levels increased by ~70% (Fig. 3B) in muscles from the I leg at I8 ($P < 0.05$ vs. NI leg or the PF group). Smac/DIABLO protein levels remained slightly elevated during the recovery period in muscles from the I leg compared to PF group or the NI leg, while XIAP protein levels were normalized to the PF values as soon as R10 (Fig. 3A and B). Thus, the XIAP to Smac/DIABLO protein ratio diminished by ~50% in muscles from the I leg at I8, and remained low during the recovery period (~−20 to ~−50% vs. PF group) (Fig. 3C).

This decreased XIAP to Smac/DIABLO protein ratio at I8 in gastrocnemius muscles from the I leg was correlated with increased apoptosome-linked caspase-9 (Fig. 4A, +60%, $P < 0.05$ I leg vs. NI leg), and caspase-3 (Fig. 4B, +48% $P < 0.05$ I leg vs. NI leg) activities. The caspase-8 activity also increased at I8 in the I leg (+26% $P < 0.05$ I leg vs. NI leg) (Fig. 4C). All these activities were normalized as soon as R10 in muscles from the I leg when compared to muscles from the NI leg or the PF group. These two last groups exhibited similar apoptosome-linked caspase-9, caspase-3 and caspase-8 activities, which remained constant throughout the whole experimentation (Fig. 4A–C).

The apoptotic index was calculated as the number of apoptotic nuclei measured for 1000 total nuclei. At I8, this index was similar between PF and NI values. Immobilization induced a large increase in the number of apoptotic nuclei resulting in increase of the apoptotic index in the I leg of the casted rats at I8 (+250% $P < 0.05$ vs. NI leg) (Fig. 5A).

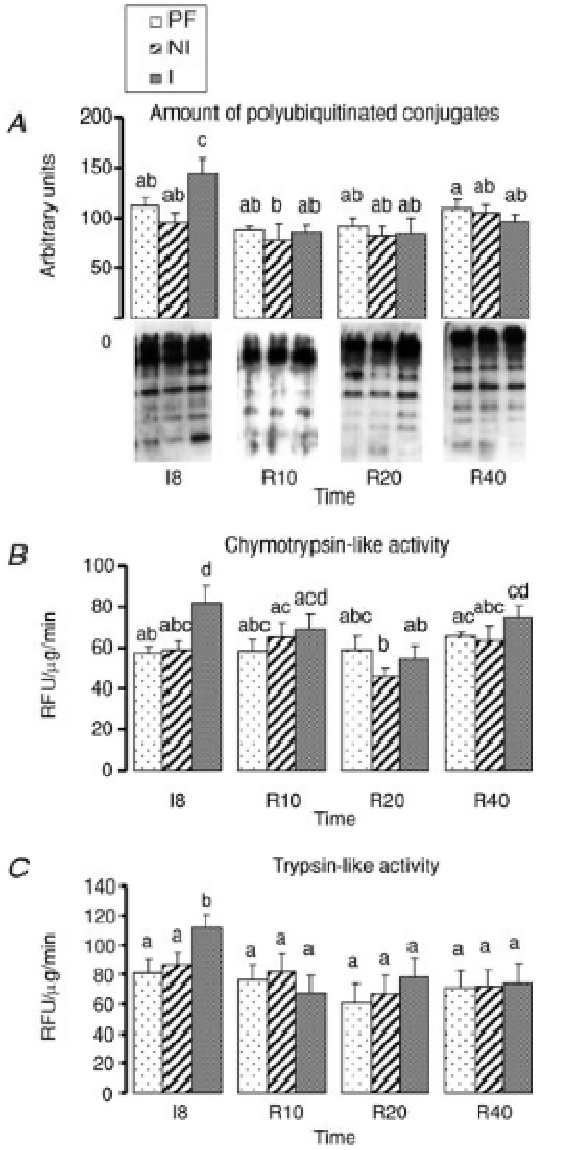


Figure 2. Ubiquitin–proteasome-dependent pathway in gastrocnemius muscles during immobilization and recovery

A, accumulation of polyubiquitinated polyconjugates was assessed on 25 µg of myofibrillar proteins by immunoblotting using an antibody that recognizes polyubiquitin chains. B and C, chymotrypsin-like activity (B) and trypsin-like activity (C) of the proteasome was measured by using the fluorogenic substrate succinyl-LLVY-AMC and Boc-LRR-AMC as indicated in Methods. Data are expressed in relative fluorescence units (RFU μg^{-1} min^{-1}). I8: 8 days of casting; R10 to R40: 10 to 40 days of recovery; PF: Pair-fed rats; NI: Non-immobilized leg; I: Immobilized leg. The change in the considered parameter from I0 to R40 was assessed using a two-way ANOVA (time, group). When significant differences were detected, post hoc comparisons between groups were made using Fisher's PLSD test. Values with a different letter are significantly different ($P < 0.05$). Data are means ± S.E.M.

© 2011 The Authors Journal compilation © 2011 The Physiological Society

tel-00719700, version 1 - 20 Jul 2012

tel-00719700, version 1 - 20 Jul 2012

Regulation of muscle regeneration

Figure 5B shows that the amount of the myf-5 protein was similar in gastrocnemius muscles from the PF group and the NI leg of the casted rats. In addition, these levels were unchanged throughout the whole experiment. The myf-5 protein levels decreased at I8 in muscles from the I leg (−48% $P < 0.05$ vs. NI leg), and returned to normal values at R10. Then, we observed an increase of myf-5 protein levels at R20 in the I leg (+58% $P < 0.05$ vs. NI leg) before a complete normalization at R40.

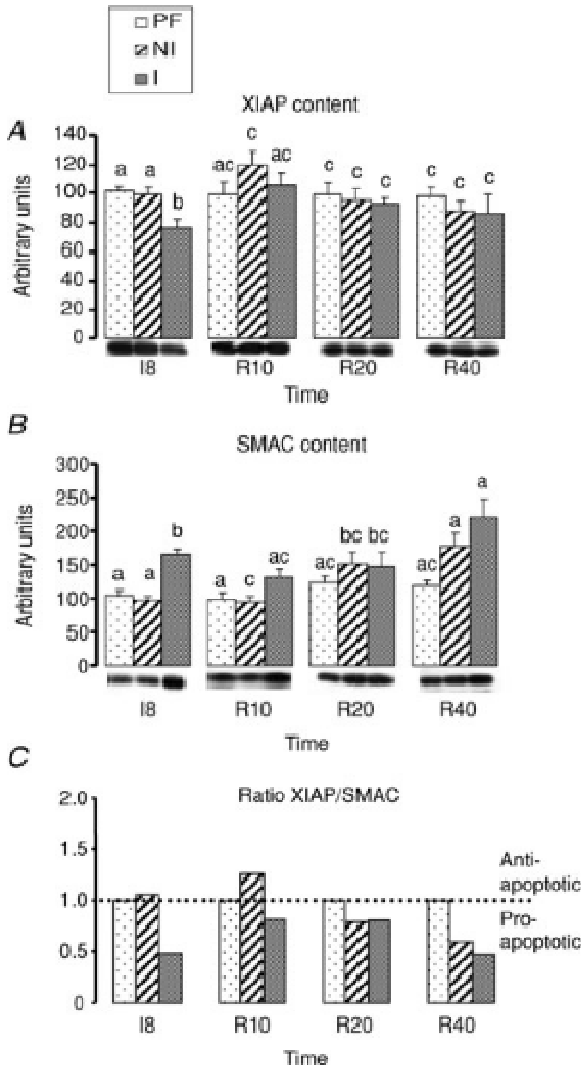


Figure 3. Regulation of pro- and anti-apoptotic factors XIAP (A) and SMAC (B), respectively, and the ratio XIAP/SMAC (C) in gastrocnemius muscles during immobilization and recovery. Amount of the both factors was evaluated by immunoblotting on 60 µg of total protein extracts. Signals were then quantified by using ImageJ software and normalized against the signal obtained with a reference sample systematically analysed on each gel. I8: 8 days of casting; R10 to R40: 10 to 40 days of recovery; PF: Pair-fed rats; NI: Non-immobilized leg; I: Immobilized leg. The change in the considered parameter from I0 to R40 was assessed using a two-way ANOVA (time, group). When significant differences were detected, post hoc comparisons between groups were made using Fisher's PLSD test. Values with a different letter are significantly different ($P < 0.05$). Data are means ± S.E.M.

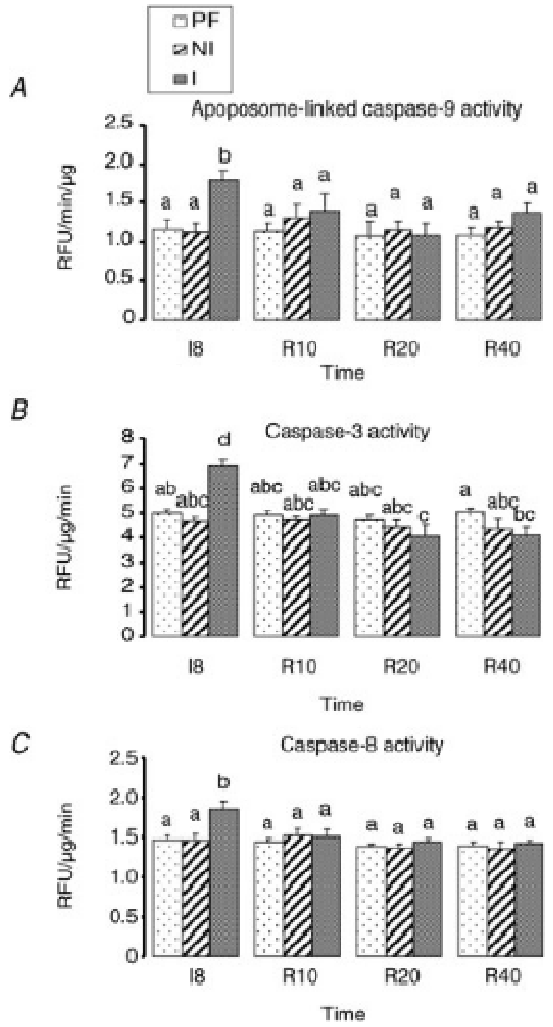


Figure 4. Caspase-dependent apoptotic pathways in gastrocnemius muscles during immobilization and recovery. A, apoptosome activity was evaluated by measuring apoptosome-linked caspase-9 activity by addition of the caspase-9 fluorogenic substrate as described in Methods. B and C, caspase-3 (B) and caspase-8 (C) activities were assessed on 25 µl of cytosolic protein extracts by using a specific substrate. All activities were obtained by calculating the accumulation of AMC after hydrolysis of the substrate vs. time and are given in relative fluorescence units (RFU μg^{-1} min^{-1}). I8: 8 days of casting; R10 to R40: 10 to 40 days of recovery; PF: Pair-fed rats; NI: Non-immobilized leg; I: Immobilized leg. The change in the considered parameter from I0 to R40 was assessed using a two-way ANOVA (time, group). When significant differences were detected, post hoc comparisons between groups were made using Fisher's PLSD test. Values with a different letter are significantly different ($P < 0.05$). Data are means ± S.E.M.

© 2011 The Authors Journal compilation © 2011 The Physiological Society

Intramuscular inflammatory and redox status

Figure 6 shows that MCP-1 protein levels, total glutathione content, protein carbonyl content and TBARS did not change during the immobilization and recovery in muscles from the PF group and the NI leg. At I8, MCP-1 content increased in the I leg (+77% and +68% vs. PF group and NI leg respectively, $P < 0.05$) and was normalized thereafter (Fig. 6A).

Figure 6B shows an increase in the total glutathione content in the I leg at I8 (+41% and +37% vs. PF group and NI leg respectively, $P < 0.05$). The total glutathione content was elevated in muscles from the I leg at R20 (+16% vs. PF group, $P < 0.05$); it remained identical between the PF and the NI group during the recovery period. Protein carbonyl content also increased at I8 in muscles from the I leg (+14% vs. PF group or NI leg, $P < 0.05$) and was normalized between the I leg and the PF group during the recovery (Fig. 6C). No difference in TBARS contents was observed between I muscles compared either to the NI or the PF groups. However, they tend to increase progressively between I8 and R40 in the I leg (+25%, $P < 0.05$), and at R40 between the I and the PF groups ($P = 0.098$) (Fig. 6C).

Discussion

In the present study, we demonstrated that 8 days of immobilization in old rats resulted in skeletal muscle atrophy associated with a co-activation of the ubiquitin–proteasome-dependent proteolysis (UPS) and the caspase-dependent apoptotic pathways. During the subsequent recovery, these pathways were rapidly normalized, although skeletal muscle mass did not recover even 40 days after cast removal.

We reported that all processes measured in the mitochondria-associated apoptotic or the UPS pathways were concomitantly activated during immobilization. Firstly, we showed an imbalance between apoptotic and regeneration/differentiation processes in favour of apoptosis leading to an increase by 250% of the number of apoptotic nuclei in the immobilized limb. This DNA fragmentation has also been observed in adult rats during disuse (Allen et al. 1997), but to a lesser extent in the same model of cast immobilization (+96%) (Vazeille et al. 2008). Conversely, the apoptotic index increased much more in adult (~+500%) than in old (~+200%) rats subjected to hindlimb suspension (Jackson et al. 2010). Mechanisms responsible for these discrepancies in old rat muscles in response to disuse remain unknown. However, the increase in apoptotic nuclei may result specifically from apoptosis of cells of the stroma (e.g. satellite cells, smooth vascular cells). This would suggest for instance an impaired capacity of satellite cells to differentiate or alterations of the micro-vascularization of muscle cells, leading to a reduced ability of myofibres to cope with mechanical stress. The ratio of XIAP to Smac/DIABLO proteins may play a key role in the activation of the mitochondria-associated apoptotic pathway. Indeed, XIAP binds to the apoptosome complex and inhibits the activation of pro-caspase-3 (Burke et al. 2010). This may ultimately modulate the degree of DNA fragmentation. In addition, the Smac/DIABLO proteins are pro-apoptotic factors secreted by the mitochondria, which can increase the caspase-processing activity of the purified apoptosome complex by 6- to 8-fold (Twiddy et al. 2004). Thus the ratio of XIAP to Smac/DIABLO proteins should reflect the entry into apoptosis through the apoptosome. Accordingly, this ratio decreased to the same extent in adult and old rats (~−50%, Vazeille et al. (2008) and the present study). However, a lower increase of muscle apoptosome-linked

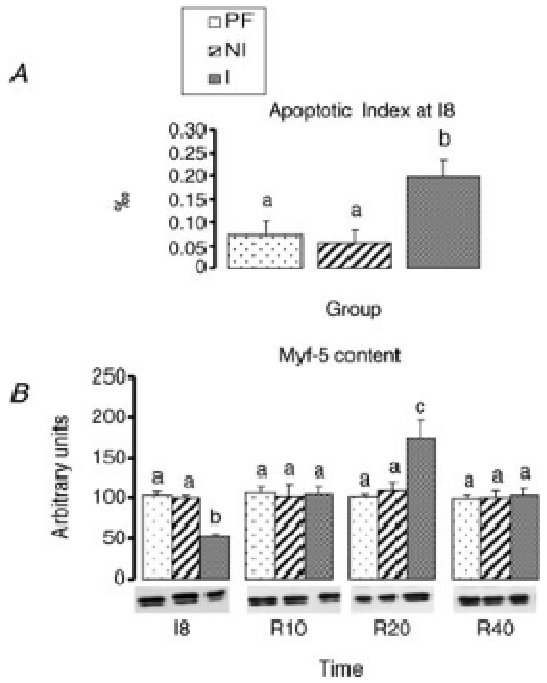


Figure 5. Apoptotic index and myogenic marker myf-5 as assessed as regenerative potential of the gastrocnemius muscles

A, the amount of the early myogenic marker myf-5 was assessed by immunoblotting. Representative immunoblots are also shown. Signals were quantified by using ImageJ software and normalized against the signal obtained with a reference sample systematically analysed on each gel. B, apoptotic index is defined as the number of apoptotic nuclei per 1000 total nuclei and was measured at I8. I8: 8 days of casting; R10 to R40: 10 to 40 days of recovery; PF: Pair-fed rats; NI: Non-immobilized leg; I: Immobilized leg. The change in the considered parameter from I0 to R40 was assessed using a two-way ANOVA (time, group). When significant differences were detected, post hoc comparisons between groups were made using Fisher's PLSD test. Values with a different letter are significantly different ($P < 0.05$). Data are means ± S.E.M.

© 2011 The Authors. Journal compilation © 2011 The Physiological Society

tel-00719700, version 1 - 20 Jul 2012

caspase-9 and caspase-3 activities was observed in our study compared to the changes observed in adult rats. Upstream pro- and anti-apoptotic proteins (i.e. Bax and Bcl-2) modulate the mitochondrial integrity and the release of pro-apoptotic proteins such as cytochrome c into the cytosol. They are therefore key regulators of the intrinsic mitochondrial apoptotic pathway (Harrada & Grant, 2003). Alterations of Bax and Bcl-2 expression have been reported in aged animals (Alway et al. 2003) subjected to hindlimb suspension (Siu et al. 2005a,c). Altogether, this suggests that changes of the abundance of these upstream regulators should also prevail in immobilized muscles from old rats, leading to changes in the XIAP to Smac/DIABLO protein ratio and to the activation of the apoptosome and caspase-3.

We also report an activation of caspase-8 during immobilization, suggesting that the death receptor-mediated apoptotic pathway may also be enhanced. This is in accordance with previous reports of disuse perturbations in younger adult (Ferreira et al. 2008; Andrianjafiniony et al. 2010) and old rats (Alway et al. 2003). In addition, alterations of the death-receptor apoptotic pathway prevailed in old muscles (Pistilli et al. 2006; Marzetti et al. 2008). However, we cannot exclude the role of other apoptotic pathways, such as the mitochondrial caspase-independent apoptotic

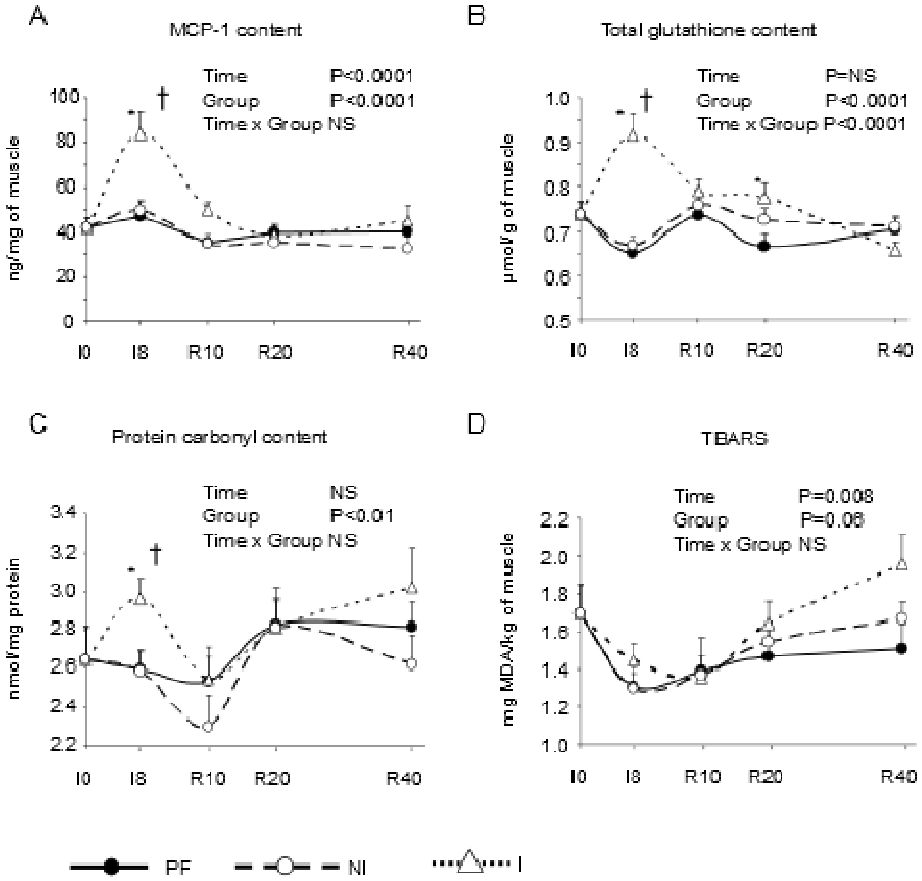


Figure 6. Inflammatory and oxidative stress markers induced by immobilization in gastrocnemius muscles

A, the MCP-1 protein content was elevated in I muscles at I8 and then normalized. MCP-1 protein content was expressed in ng (mg of muscle)$^{-1}$. B, the total glutathione increased in I muscles at I8 indicating an activation of antioxidant defences. Total glutathione content is expressed in µmol (g of muscle)$^{-1}$. C and D, protein and lipid oxidation were assessed by measuring protein carbonyl content (C) and TBARS (D), respectively. Protein oxidation is generated in I muscles at I8 whereas lipid oxidation was generated at R40. Protein carbonyl content is expressed in nmol (mg proteins)$^{-1}$ and TBARS in mg MDA (malonedialdehydes) (kg of muscle)$^{-1}$. I8: 8 days of casting; R10 to R40: 10 to 40 days of recovery; PF: Pair-fed rats; NI: Non-immobilized leg; I: Immobilized leg. The change in the considered parameter from I0 to R40 was assessed using a two-way ANOVA (time, group). When significant differences were detected, post hoc comparisons between groups were made using Fisher's PLSD test. *$P < 0.05$, I vs. PF; †$P < 0.05$, I vs. NI. Data are means ± s.e.m.

© 2011 The Authors Journal compilation © 2011 The Physiological Society

tel-00719700, version 1 - 20 Jul 2012

pathway. Indeed, this pathway, mediated by AIF (Apoptosis-inducing factor) and endo G, increased with skeletal muscle mass loss during disuse (Su & Alway, 2005) and ageing (Su et al. 2005a), and may be differentially regulated upon disuse during ageing (Su et al. 2005a). Altogether, this suggests that activation of both intrinsic and extrinsic pathways of apoptosis resulted in disuse-induced muscle atrophy in old rats, but also that the caspase-independent apoptotic pathway may be involved.

We also demonstrated that immobilization induced an activation of the UPS in old muscles, as previously reported in young rats during hindlimb suspension (Taillandier et al. 1996; Bodine et al. 2001; Berthon et al. 2007) or cast immobilization (Krawiec et al. 2005; Vazeille et al. 2008). The UPS was also activated to a lesser extent during ageing: the proteasome chymotrypsin-like activity increased only by 53% in old rats (present study), while a 138% increase was reported in adult rats (Vazeille et al. 2008). However, the immobilization-induced muscle atrophy remained similar at both ages with 21% and 23% in old and adult rats, respectively. This indicates that additional mechanisms leading to muscle loss during disuse may take place during ageing. As the size of the muscle protein compartment also depends on the rate of protein synthesis, it may be hypothesized that muscle protein synthesis was probably more affected in old animals than in younger adults to generate the same atrophy at both ages. Even if a decrease in protein synthesis cannot be excluded in the mechanisms leading to muscle atrophy during disuse in adults (Goldspink, 1977; Paddon-Jones et al. 2006; de Boer et al. 2007), this differential response of muscle proteolysis between adult and old animals has nevertheless been previously observed in other catabolic and/or anabolic situations. Loss of proteasome function has been reported in several old human and animal tissues and reviewed in Combaret et al. (2009). For example, muscle proteolysis remained less sensitive to the effect of glucocorticoids in old rats than in adults despite similar muscle atrophy (Dardevet et al. 1995). In that situation, muscle wasting resulted from depressed protein synthesis in old animals (not recorded in adults). Altogether, this suggest that these altered proteolytic and apoptotic responses to immobilization may, at least in part, account for the lower ability of the aged organism to adapt to external stresses.

In contrast with our previous work showing that muscle recovery was initiated as soon as 15 days after cast removal in adult rats (Vazeille et al. 2008), we reported here that old rats were unable to recover muscle mass even 40 days after cast removal. These observations confirm that ageing alters the muscle capacity to recover from any catabolic period, which may be pathological, nutritional or result from inactivity. Indeed, this age-related lack of muscle mass recovery has been already observed following immobilization (Chakravarthy et al. 2000; Pattison et al. 2003), but also following other catabolic situations such as glucocorticoid treatment (Dardevet et al. 1995) or starvation (Mosoni et al. 1999). This absence of recovery leads to cumulative muscle mass loss during ageing that could worsen sarcopaenia, but also if repeated over time can be a mechanism by which sarcopaenia develops. The cause of this lack of muscle mass recovery in the elderly following immobilization remains mostly unknown. Chakravarthy et al. (2000) have nevertheless shown that the proliferative potential of gastrocnemius resident satellite cells decreased after a single bout of cast immobilization and this could partly explain the lack of recovery of muscle mass. In the present study, the decreased content of the myogenic factor myf-5, which is normally induced during satellite cell activation, was normalized during the recovery period and even increased after 20 days of recovery. In our study, the absence of muscle mass recovery cannot be totally explained by a diminished regenerative potential in old rat skeletal muscle. On the other hand, we observed a complete normalization of both the UPS and the caspase associated pathways of apoptosis, which occurred early in the recovery period, i.e. as soon as R10. This clearly indicates that the absence of recovery observed in our study did not result from a defect in the down-regulation of these two pathways. However, muscle mass recovery also depends in the generation of a positive nitrogen balance, which results from a muscle protein synthesis greater than proteolysis. Taken together, our data strongly suggest that old rat muscles were unable to enhanced protein synthesis after cast removal. It is not so surprising since some data already indicated that muscle protein synthesis was resistant to anabolic stimuli in the elderly. Indeed, it is now well established that the stimulating effect of food intake on muscle anabolism is altered in both animals and humans (reviewed in Balage & Dardevet, 2010). These alterations in muscle protein synthesis response have been proposed to be a consequence of a low grade inflammation and/or oxidative stress development (Marzani et al. 2008; Rieu et al. 2009). Interestingly, according to other studies (Kondo et al. 1991; Zarzhevsky et al. 2001; Lawler et al. 2003; Biolo et al. 2008), we reported here that immobilization leads to an increase of inflammatory and oxidative stress markers. We further showed that a chronic 'low grade' oxidative stress may also be present during the recovery period, as TBARS slightly increased from R10 to R40 in the recovering I leg. Indirectly, measurement of caspase-8 activity may also be related to the inflammatory status of the animals. The extrinsic apoptotic pathway, which controls the activation of caspase-8, is triggered by the activation of the death receptor family (e.g. proinflammatory cytokine TNFα receptors) (Pistilli et al. 2006). Muscle protein anabolism might have been challenged by the local maintenance

© 2011 The Authors. Journal compilation © 2011 The Physiological Society

tel-00719700, version 1 - 20 Jul 2012

of chronic immobilization-induced oxidative damages and inflammation during the recovery period, and this may have contributed to the lack of recovery in old rats.

Surprisingly, a significant muscle mass loss prevailed in the non-immobilized leg 20 days after cast removal. To our knowledge this effect has never been described. We exclude the possibility of a general diminution of physical activity because this phenomenon occurred during the recovery period and not during the immobilization period. Moreover, this phenomenon is absent in the group of non-casted pair-fed animals, and therefore cannot be attributed to the decreased food intake during immobilization. As observed in the immobilized leg during the recovery period, the ratio of XIAP to Smac/DIABLO decreased also in the non-immobilized leg. This diminution is in favor of the entry into apoptosis and has been reported to be sensitive to minocycline, an anti-inflammatory compound (Scarabelli et al. 2004). Altogether, this suggested that immobilization by casting might have generated a systemic inflammatory effect in old rats, which induced muscle mass loss also in the non-immobilized leg or more generally at the whole body level. Our observation is consistent with the study of Chen et al. (2007) who showed that immobilization by casting of adult volunteers affected not only the immobilized limb but also the gene expression in the contralateral leg. The genes affected were involved in stress response, sarcomere structure, cell growth/death and interestingly in protein turnover regulation. However, we could not record any increase in the UPS or the caspase-dependent apoptotic pathways in the non-immobilized leg. Further studies are thus necessary to assess the mechanisms by which immobilization may affect whole body protein turnover and muscle mass.

Taken together, we showed that, if the primary effect of casting was the atrophy of the immobilized limb, the secondary one was not only the absence of muscle recovery, but also a muscle loss in the contralateral leg that may reflect a generalized whole body protein loss. The impaired muscle recovery during reloading in ageing did not result from a defect in the normalization of the UPS or the caspase-dependent apoptotic pathways, but presumably resulted from the inability of old muscles to develop an anabolic response following cast removal. Further investigations are clearly needed to identify the limiting factor for muscle accretion after an immobilization-induced atrophy and to explore more deeply the mechanism(s) responsible for the contralateral leg muscle atrophy.

References

Adhihetty PJ & Hood DA (2003). Mechanisms of apoptosis in skeletal muscle. Basic Appl Myol 13, 171–179.

Allen DL, Linderman JK, Roy RR, Bigbee AJ, Grindeland RE, Mukku V & Edgerton VR (1997). Apoptosis: a mechanism contributing to remodeling of skeletal muscle in response to hindlimb unweighting. Am J Physiol Cell Physiol 273, C579–587.

Alway SE, Degens H, Krishnamurthy G & Chaudhrai A (2003). Denervation stimulates apoptosis but not Id2 expression in hindlimb muscles of aged rats. J Gerontol 58, 687–697.

Andrianjafiniony T, Dupre-Aucouturier S, Letexier D, Couchoux H & Desplanches D (2010). Oxidative stress, apoptosis, and proteolysis in skeletal muscle repair after unloading. Am J Physiol Cell Physiol 299, C307–315.

Attaix D, Ventadour S, Codran A, Bechet D, Taillandier D & Combaret L (2005). The ubiquitin-proteasome system and skeletal muscle wasting. Essays Biochem 41, 173–186.

Balage M & Dardevet D (2010). Long-term effects of leucine supplementation on body composition. Curr Opin Clin Nutr Metab Care 13, 265–270.

Berthon P, Duguez S, Favier FB, Amirouche A, Feasson L, Vico L, Denis C & Freyssenet D (2007). Regulation of ubiquitin-proteasome system, caspase enzyme activities, and extracellular proteinases in rat soleus muscle in response to unloading. Pflugers Arch 454, 625–633.

Biolo G, Agostini F, Simunic B, Sturma M, Torelli L, Preiser JC, Deby-Dupont G, Magni P, Strollo F, di Prampero P, Guarnieri G, Mekjavic IB, Pisot R & Narici MV (2008). Positive energy balance is associated with accelerated muscle atrophy and increased erythrocyte glutathione turnover during 5 wk of bed rest. Am J Clin Nutr 88, 950–958.

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.

Burke SP, Smith L & Smith JB (2010). dAP1 cooperatively inhibits procaspase-3 activation by the caspase-9 apoptosome. J Biol Chem 285, 30061–30068.

Cain K, Brown DG, Langlais C & Cohen GM (1999). Caspase activation involves the formation of the aposome, a large (approximately 700 kDa) caspase-activating complex. J Biol Chem 274, 22686–22692.

Chakravarthy MV, Davis BS & Booth FW (2000). IGF-I restores satellite cell proliferative potential in immobilized old skeletal muscle. J Appl Physiol 89, 1365–1379.

Chen YW, Gregory CM, Scarborough MT, Shi R, Walter GA & Vandenborne K (2007). Transcriptional pathways associated with skeletal muscle disuse atrophy in humans. Physiol Genomics 31, 510–520.

Combaret L, Dardevet D, Bechet D, Taillandier D, Mosoni L & Attaix D (2009). Skeletal muscle proteolysis in aging. Curr Opin Clin Nutr Metab Care 12, 37–41.

Combaret L, Dardevet D, Rieu I, Pouch MN, Bechet D, Taillandier D, Grizard J & Attaix D (2005). A leucine-supplemented diet restores the defective postprandial inhibition of proteasome-dependent proteolysis in aged rat skeletal muscle. J Physiol 569, 489–499.

Conboy IM, Conboy MJ, Smythe GM & Rando TA (2003). Notch-mediated restoration of regenerative potential to aged muscle. Science 302, 1575–1577.

© 2011 The Authors. Journal compilation © 2011 The Physiological Society

tel-00719700, version 1 - 20 Jul 2012

Dardevet D, Sornet C, Taillandier D, Savary I, Attaix D & Grizard J (1995). Sensitivity and protein turnover response to glucocorticoids are different in skeletal muscle from adult and old rats. Lack of regulation of the ubiquitin-proteasome proteolytic pathway in aging. J Clin Invest 96, 2113–2119.

de Boer M, Selby A, Atherton P, Smith K, Seynnes O, Maganaris C, Maffulli N, Movin T, Narici M & Rennie M (2007). The temporal responses of protein synthesis, gene expression and cell signalling in human quadriceps muscle and patellar tendon to disuse. J Physiol 558, 241–251.

Dirks AJ & Leeuwenburgh C (2004). Aging and lifelong calorie restriction result in adaptations of skeletal muscle apoptosis repressor, apoptosis-inducing factor, X-linked inhibitor of apoptosis, caspase-3, and caspase-12. Free Radic Biol Med 36, 27–39.

Drummond GB (2009). Reporting ethical matters in The Journal of Physiology: standards and advice. J Physiol 587, 713–719.

Dupont-Versteegden EE (2005). Apoptosis in muscle atrophy: relevance to sarcopenia. Exp Gerontol 40, 473–481.

English KL & Paddon-Jones D (2010). Protecting muscle mass and function in older adults during bed rest. Curr Opin Clin Nutr Metab Care 13, 34–39.

Evans W (1997). Functional and metabolic consequences of sarcopenia. J Nutr 127, 998S–1003S.

Fang CH, Li BG, Fischer DR, Wang JJ, Runnels HA, Monaco JJ & Hasselgren PO (2000). Burn injury upregulates the activity and gene expression of the 20 S proteasome in rat skeletal muscle. Clin Sci (Lond) 99, 181–187.

Ferreira R, Neuparth MJ, Vitorino R, Appell HJ, Amado F & Duarte JA (2008). Evidences of apoptosis during the early phases of soleus muscle atrophy in hindlimb suspended mice. Physiol Res 57, 601–611.

Goldspink DF (1977). The influence of immobilization and stretch on protein turnover of rat skeletal muscle. J Physiol 264, 267–282.

Harrada H & Grant S (2003). Apoptosis regulators. Rev Clin Exp Hematol 7, 117–138.

Harris T (1997). Muscle mass and strength: relation to function in population studies. J Nutr 127, 1004S–1006S.

Hughes VA, Frontera WR, Wood M, Evans WJ, Dallal GE, Roubenoff R & Fiatarone Singh MA (2001). Longitudinal muscle strength changes in older adults: influence of muscle mass, physical activity, and health. J Gerontol 56, B209–217.

Ikemoto M, Nikawa T, Takeda S, Watanabe C, Kitano T, Baldwin KM, Izumi R, Nonaka I, Towatari T, Teshima S, Rokutan K & Kishi K (2001). Space shuttle flight (STS-90) enhances degradation of rat myosin heavy chain in association with activation of ubiquitin-proteasome pathway. FASEB J 15, 1279–1281.

Jackson JR, Ryan MJ, Hao Y & Alway SE (2010). Mediation of endogenous antioxidant enzymes and apoptotic signaling by resveratrol following muscle disuse in the gastrocnemius muscles of young and old rats. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol (in press).

Kondo H, Miura M & Itokawa Y (1991). Oxidative stress in skeletal muscle atrophied by immobilization. Acta Physiol Scand 142, 527–528.

Krawiec BJ, Frost RA, Vary TC, Jefferson LS & Lang CH (2005). Hindlimb casting decreases muscle mass in part by proteasome-dependent proteolysis but independent of protein synthesis. Am J Physiol Endocrinol Metab 289, E969–980.

Kujawa M, Baran W & Jankowska-Steifer E (2005). Quantitative ultrastructural changes in satellite cells of rats immobilized after soleus muscle denervation. Exp Mol Pathol 78, 78–85.

Lawler JM, Song W & Demaree SR (2003). Hindlimb unloading increases oxidative stress and disrupts antioxidant capacity in skeletal muscle. Free Radic Biol Med 35, 9–16.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL & Randall RJ (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem 193, 265–275.

Lynch SM & Frei B (1993). Mechanisms of copper- and iron-dependent oxidative modification of human low density lipoprotein. J Lipid Res 34, 1745–1753.

Marzani B, Balage M, Venien A, Astruc T, Papet I, Dardevet D & Mosoni L (2008). Antioxidant supplementation restores defective leucine stimulation of protein synthesis in skeletal muscle from old rats. J Nutr 138, 2205–2211.

Marzetti E, Carter CS, Wohlgemuth SE, Lees HA, Giovannini S, Anderson B, Quinn LS & Leeuwenburgh C (2009). Changes in IL-15 expression and death-receptor apoptotic signaling in rat gastrocnemius muscle with aging and life-long calorie restriction. Mech Ageing Dev 130, 272–280.

Marzetti E, Wohlgemuth SE, Lees HA, Chung HY, Giovannini S & Leeuwenburgh C (2008). Age-related activation of mitochondrial caspase-independent apoptotic signaling in rat gastrocnemius muscle. Mech Ageing Dev 129, 542–549.

Mercier Y, Gatellier P, Viau M, Remignon H & Renerre M (1998). Effect of dietary fat and vitamin E on lipid and protein oxidation in turkey meat during storage. Meat Sci 48, 301–317.

Mosoni L, Malmezat T, Valluy MC, Houlier ML, Attaix D & Mirand PP (1999). Lower recovery of muscle protein lost during starvation in old rats despite a stimulation of protein synthesis. Am J Physiol Endocrinol Metab 277, E608–616.

Oliver CN, Ahn BW, Moerman EJ, Goldstein S & Stadtman ER (1987). Age-related changes in oxidized proteins. J Biol Chem 262, 5488–5491.

Paddon-Jones D, Sheffield-Moore M, Cree MG, Hewlings SJ, Aarsland A, Wolfe RR & Ferrando AA (2006). Atrophy and impaired muscle protein synthesis during prolonged inactivity and stress. J Clin Endocrinol Metab 91, 4836–4841.

Pattison JS, Folk LC, Madsen RW & Booth FW (2003). Selected Contribution: Identification of differentially expressed genes between young and old rat soleus muscle during recovery from immobilization-induced atrophy. J Appl Physiol 95, 2171–2179.

Pistilli EE, Jackson JR & Alway SE (2006). Death receptor-associated pro-apoptotic signaling in aged skeletal muscle. Apoptosis 11, 2115–2126.

tel-00719700, version 1 - 20 Jul 2012

c 2011 The Authors. Journal compilation c 2011 The Physiological Society

Plant P J, Bain J R, Correa J E, Woo M & Batt J (2009). Absence of caspase-3 protects against denervation-induced skeletal muscle atrophy. J Appl Physiol 107, 224–234.

Rieu I, Magne H, Savary-Auzeloux I, Averous J, Bos C, Peyron M A, Combaret L & Dardevet D (2009). Reduction of low grade inflammation restores blunting of postprandial muscle anabolism and limits sarcopenia in old rats. J Physiol 587, 5483–5492.

Robinson M K, Rounds J D, Hong R W, Jacobs D O & Wilmore D W (1992). Glutathione deficiency increases organ dysfunction after hemorrhagic shock. Surgery 112, 140–147; discussion 148–149.

Rosenberg I H (1989). Summary comments. Am J Clin Nutr 50, 1231–1233.

Scarabelli T M, Stephanou A, Pasini E, Gitti G, Townsend P, Lawrence K, Chen-Scarabelli C, Saravolatz L, Latchman D, Knight R & Gardin J (2004). Minocycline inhibits caspase activation and reactivation, increases the ratio of XIAP to smac/DIABLO, and reduces the mitochondrial leakage of cytochrome C and smac/DIABLO. J Am Coll Cardiol 43, 865–874.

Siu P M & Alway S E (2005). Mitochondria-associated apoptotic signalling in denervated rat skeletal muscle. J Physiol 565, 309–323.

Siu P M, Pistilli E E & Alway S E (2006a). Apoptotic responses to hindlimb suspension in gastrocnemius muscles from young adult and aged rats. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 289, R1015–1026.

Siu P M, Pistilli E E, Ryan M J & Alway S E (2006b). Aging sustains the hypertrophy-associated elevation of apoptotic suppressor X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP) in skeletal muscle during unloading. J Gerontol 60, 976–983.

Siu P M, Pistilli E E, Butler D C & Alway S E (2006c). Aging influences cellular and molecular responses of apoptosis to skeletal muscle unloading. Am J Physiol Cell Physiol 288, C338–349.

Suetta C, Hvid L G, Justesen L, Christensen U, Neergaard K, Simonsen L, Ortenblad N, Magnusson S P, Kjaer M & Aagaard P (2009). Effects of aging on human skeletal muscle after immobilization and retraining. J Appl Physiol 107, 1172–1180.

Taillandier D, Aurousseau E, Meynial-Denis D, Bechet D, Ferrara M, Cottin P, Ducastaing A, Bigard X, Guezennec C Y, Schmid H P, et al. (1996). Coordinate activation of lysosomal, Ca^{2+}-activated and ATP-ubiquitin-dependent proteinases in the unweighted rat soleus muscle. Biochem J 316, 65–72.

Twiddy D, Brown D G, Adrain C, Jukes R, Martin S J, Cohen G M, MacFarlane M & Cain K (2004). Pro-apoptotic proteins released from the mitochondria regulate the protein composition and caspase-processing activity of the native Apaf-1/caspase-9 apoptosome complex. J Biol Chem 279, 19665–19682.

Vazeille E, Codran A, Claustre A, Averous J, Listrat A, Bechet D, Taillandier D, Dardevet D, Attaix D & Combaret L (2008). The ubiquitin-proteasome and the mitochondria-associated apoptotic pathways are sequentially downregulated during recovery after immobilization-induced muscle atrophy. Am J Physiol Endocrinol Metab 295, E1181–1190.

Wing S S, Haas A L & Goldberg A L (1995). Increase in ubiquitin-protein conjugates concomitant with the increase in proteolysis in rat skeletal muscle during starvation and atrophy denervation. Biochem J 307, 639–645.

Zarzhevsky N, Menashe O, Carmeli E, Stein H & Reznick A Z (2001). Capacity for recovery and possible mechanisms in immobilization atrophy of young and old animals. Ann N Y Acad Sci 928, 212–225.

Author contributions

H.M., D.D. and L.C. contributed to the conception and design of the experiments. H.M., I.S.A., E.V., A.C., D.A., A.L., V.S.L., P.G., D.D. and L.C. participated to the collection, analysis and interpretation of the data. All authors drafted the manuscript and approved the final version for publication. All experiments were performed in the Unité de Nutrition Humaine, the Unité de Recherche sur les Herbivores and the Unité Qualité des Produits Animaux from the Institut National de la Recherche Agronomique (Saint Genès-Champanelle, France).

Acknowledgements

We thank Arlette Cissoire, Benoit Cohade and Christian Lafarge from the IEN (INRA, Clermont-Ferrand-Theix, France) for their excellent assistance during animal experimentation. We also thank Claude Ferreira for protein and lipid oxidation measurements, Claire Sornet, Kelly Skorzybot and Caroline Habauzit for their technical assistance and Hélène Lafarge for help in the management of the bibliography. This study was supported by grants from the Institut National de la Recherche Agronomique and the Association Française contre les Myopathies. H.M. and E.V. were supported by a PhD fellowship from the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche.

© 2011 The Authors. Journal compilation © 2011 The Physiological Society

tel-00719700, version 1 - 20 Jul 2012

tel-00719700, version 1 - 20 Jul 2012

Publication 2

The Lack of Recovery of Muscle Mass during Aging Cannot Be Overcome by a Dietary Free Leucine Supplementation after Prolonged Immobilization

H. Magne, I. Savary-Auzeloux, C. Migné, L. Combaret, D. Rémond & D. Dardevet

A soumettre, J Physiol.

tel-00719700, version 1 - 20 Jul 2012

Introduction :

Nos résultats précédents ont montré qu'une période d'immobilisation chez le rat âgé entraînait une perte de masse musculaire non récupérée (Magne et coll. 2011). Ces phénomènes de non récupération musculaire ont déjà été mis en évidence au cours du vieillissement (Chakravarthy et coll. 2000 ; Suetta et coll. 2009) et peuvent participer à la mise en place de la sarcopénie comme l'un des éléments du « catabolic crisis model » décrit par English & Paddon-Jones (2010), dans lequel chaque épisode catabolique suivi par une récupération incomplète de masse musculaire aggraverait l'atrophie musculaire liée à l'âge. La perte de masse musculaire induite par l'immobilisation est liée à une augmentation de la dégradation des protéines musculaires par le système ubiquitine-protéasome-dépendant et une perte des cellules musculaires due à une augmentation des processus apoptotiques et une diminution des processus de régénération/différenciation musculaire. Le fait que ces voies ne soient que normalisées au cours de la période de récupération permettrait en partie d'expliquer l'absence de récupération musculaire (Magne et coll. 2011). Chez l'adulte immobilisé, la protéosynthèse musculaire est diminuée à l'état postabsorptif au cours de l'immobilisation (Gibson et coll. 1987) puis augmentée en période de récupération (Booth 1982). Ceci associé à une normalisation ou une diminution de la dégradation protéique au cours de la récupération permettrait à l'adulte de récupérer la masse musculaire perdue (Vazeille et coll. 2008). Si la protéosynthèse semble réduite après une immobilisation chez des sujets âgés (Kortebein et coll. 2007), aucune donnée n'est disponible en période de récupération musculaire. Certains auteurs suggèrent ainsi que la « décharge musculaire » pourrait induire une « résistance anabolique » du muscle à la protéosynthèse, c'est-à-dire une moindre réponse à l'effet anabolique des acides aminés (Glover et coll. 2008 ; Phillips et coll. 2009 ; Rennie et coll. 2010). Ces données et celles obtenues précédemment par notre équipe suggèrent donc que la synthèse protéique pourrait être altérée en période de récupération au cours du vieillissement, expliquant le défaut de gain protéique.

Le repas stimule fortement la protéosynthèse musculaire (Kimball et coll. 2000). Cependant cet effet semble perdu au cours du vieillissement (Balage & Dardevet 2010) sans doute à cause de la présence d'une inflammation chronique de faible intensité et/ou d'un stress oxydant (Marzani et coll. 2008 ; Rieu et coll. 2009) susceptibles de perturber les voies de signalisation de la protéosynthèse. De plus, l'immobilisation est associée à la

présence d'une inflammation et d'un stress oxydant intramusculaires (Kondo et coll. 1991 ; Biolo et coll. 2008 ; Magne et coll. 2011). La période postprandiale jouant un rôle essentiel dans l'accrétion protéique, cette phase pourrait donc être altérée au cours du vieillissement et de l'immobilisation, expliquant le défaut de récupération musculaire.

La leucine est un acide aminé bien connu pour son effet inhibiteur de la dégradation protéique et stimulateur de la synthèse protéique (Buse & Reid 1975 ; Frexes-Steed et coll. 1992 ; Crozier et coll. 2005) en particulier au cours du vieillissement (Dardevet et coll. 2002 ; Katsanos et coll. 2006 ; Combaret et coll. 2005 ; Rieu et coll. 2003-2006-2007). Son action passerait par la stimulation de la voie mTOR (*mammalian target of rapamycin*), de l'activité de la p70S6 kinase ainsi qu'une augmentation de la phosphorylation des protéines 4E-BP1 et S6K1 (Dardevet et coll. 2000 ; Anthony et coll. 2000a ; Bolster et coll. 2004). Or en cas d'inflammation, le muscle devient résistant à l'effet des acides aminés (dont la leucine) (Lang et coll. 2002 ; Marzani et coll. 2008 ; Balage et coll. 2009). Le signal leucine pourrait donc être réduit au cours du vieillissement et de l'immobilisation, et cette altération pourrait persister au cours de la période de récupération musculaire, perturbant les processus de régénération. Ce travail postule qu'augmenter les apports en leucine permettrait de positiver la balance azotée et ainsi, *in fine*, d'induire la récupération de masse musculaire. Cette étude a donc pour objectifs 1/ de mesurer la synthèse protéique après une période d'immobilisation et au cours de la récupération afin de déceler des altérations de cette voie en réponse au repas et 2/ de tester l'impact d'un régime supplémenté en leucine sur la récupération musculaire.

<u>Méthodes</u> :

L'expérience a été réalisée chez des rats âgés de 22-24 mois. Les animaux ont d'abord été immobilisés par plâtrage unilatéral d'une patte arrière pendant 8 jours, puis déplâtrés et laissés en récupération musculaire pendant 10, 20, 30 et 40 jours. Pendant toute la période d'immobilisation, les animaux ont été nourris avec un régime contenant 13% de caséine. En période de récupération les animaux ont reçu soit un régime témoin (Caséine + Alanine) (groupe TEMOIN) soit un régime supplémenté avec 4,45% de leucine libre (Caséine + Leucine) (groupe LEUCINE). En parallèle, des animaux non plâtrés, *pair fed* des animaux immobilisés ont été étudiés à tous les temps et nourris avec un régime à 13% caséine. La synthèse protéique ainsi que les principales activités du protéasome (activités chymotrypsin- et trypsin-like) ont été mesurées à l'état postabsorptif et à l'état

tel-00719700, version 1 - 20 Jul 2012

postprandial. La quantité de protéines polyubiquitinées, l'abondance du facteur de transcription et de sa forme phosphorylée, ainsi que l'abondance de la protéine S6 et de sa forme phosphorylée ont été évaluées par western-blot.

Afin d'améliorer notre stratégie nutritionnelle nous avons réalisé une étude pilote au cours de laquelle des animaux âgés ont été immobilisés comme précédemment décrit, et nourris au cours de la période de récupération soit par un régime contenant 13% de lactosérum (groupe LACTO) soit un régime hyperprotéiné (13% caséine + 13% lactosérum) (groupe HYPER). Ces animaux ont été étudiés à 8 jours d'immobilisation puis 20 et 40 jours de récupération.

Principaux résultats :

L'atrophie musculaire induite par 8 jours d'immobilisation (-20% de masse dans les muscles immobilisés) était associée à une diminution de la synthèse protéique à l'état postprandial (-28% dans les muscles immobilisés) et une augmentation de la protéolyse ubiquitine-protéasome-dépendante (+27, +42 et +70% pour les activités chymotrypsin- et trypsin-like et la quantité de protéines polyubiquitinées respectivement). Au cours de la période de récupération, la synthèse protéique était plus élevée dans le groupe LEU que dans le groupe TEMOIN (+15% à R30) et ceci était associé à une augmentation de la quantité de protéine S6 phosphorylée (+30% à R30). Les activités chymotrypsin- et trypsin-like restaient élevées à R10 dans le groupe TEMOIN, mais diminuées et ainsi normalisées dans le groupe LEU (~ -18% et ~ -30% respectivement). Cependant la leucine n'a pas permis d'induire un gain de masse musculaire. La patte immobilisée restait atrophiée 20 jours après le déplâtrage sans que nos mesures puissent expliquer ce phénomène et malgré un effet leucine sur la synthèse protéique dans cette patte.

Contrairement à la supplémentation en leucine, dans les groupes LACTO et HYPER, une récupération musculaire était induite dès R20 (+300mg et +200mg respectivement sur 700mg perdus au cours de l'immobilisation). Alors que la leucine n'a pas permis de ralentir l'atrophie de la patte controlatérale, celle-ci ne ne s'atrophiait plus lorsque les rats étaient nourris avec de tels régimes.

tel-00719700, version 1 - 20 Jul 2012

Conclusion :

L'immobilisation par plâtrage chez le rat âgé induit une perte de masse musculaire qui n'est pas récupérée même 40 jours après le déplâtrage. L'atrophie musculaire induite par le plâtrage peut être expliquée par une augmentation du système ubiquitine-protéasome-dépendant et une diminution de la synthèse protéique à l'état postprandial. Le plâtrage serait donc responsable de l'apparition d'une « résistance anabolique », c'est-à-dire une diminution de l'effet stimulateur des acides aminés sur la synthèse protéique musculaire. Une supplémentation en leucine, malgré son effet positif sur le métabolisme protéique, ne permet pas d'induire un gain de masse musculaire. Nous postulons que ceci serait dû à une désynchronisation entre l'effet signal de la leucine libre et l'arrivée des autres acides aminés substrats de la synthèse protéique. Cette hypothèse semble vérifiée par l'utilisation de régimes supplémentés en lactosérum (protéine à digestion rapide induisant une augmentation rapide et massive des acides aminés plasmatiques et protéine riche en leucine) et des régimes hyperprotéinés (combinant l'effet des caséines et des protéines du lactosérum).

tel-00719700, version 1 - 20 Jul 2012

tel-00719700, version 1 - 20 Jul 2012

The Lack of Recovery of Muscle Mass during Aging Cannot Be Overcome by a Dietary Free Leucine Supplementation after Prolonged Immobilization

Magne, Hugues [1], Savary-Auzeloux, Isabelle [1], Migné, Carole [1], Combaret, Lydie [1], Rémond, Didier[1] and Dardevet, Dominique [1]

1: INRA, UMR 1019 Unité de Nutrition Humaine, 63122 Saint Genès Champanelle, France, and Clermont Université, UFR Médecine, UMR 1019 Nutrition Humaine, 63000 Clermont-Ferrand, France

INTRODUCTION

Sarcopenia is the progressive loss of muscle mass and strength associated with normal ageing (Rosenberg 1989). This phenomenon is a highly predictive factor of frailty, of limited mobility, of increased susceptibility to injury and of impaired recovery (Harris 1997). Many mechanisms have been proposed to explain sarcopenia. One of them could be periods of immobilization or acute inactivity, which increase with age and may contribute by themselves to muscle atrophy. Thus, the unloading-induced atrophy due to limb immobilization, chronic bed-rest or lack of physical inactivity impairs muscle mass and functions in elderlies (Durhan et al. 2004). These periods of uncompleted recoveries repeated overtime may result in a significant muscle mass loss and then worsen sarcopenia and is known as the “acute catabolic crises” model (English & Paddon-Jones, 2010). However, the effect of disuse by itself on skeletal muscle in elderly individuals has not been extensively investigated and the subsequent recovery ability has been even less studied despite the fact that we and others have shown an impaired recovery in old animals and elderly humans after immobilization-induced muscle atrophy (Chakravarthy et al. 2000, Suetta et al. 2009, Magne et al. 2011).

At a cellular level, muscle atrophy following immobilization results from an imbalance of protein turnover as the maintenance of skeletal muscle mass depends on the overall balance between rates of protein synthesis and protein breakdown. Protein synthesis has been reported to be reduced at the post-absorpive state in adults (Gibson et al. 1987) and muscle protein breakdown increased (Loughna et al. 1986, Taillandier et al. 1993-1996, Lawler 2003, Krawiec et al. 2005, Vazeille et al. 2008) leading to the muscle

protein loss. Muscle mass recovery after unloading is also dependent on the generation of a sustained positive nitrogen balance which results not only from normalization of changes in protein metabolism but also from increased protein synthesis, decreased proteolysis, or simultaneous changes in both processes. Thus, during recovery in adults, muscle protein synthesis was increased (Booth 1982) et muscle protein breakdown was down-regulated, normalized or increased according to the model of immobilization used (Tilignac et al. 2002, Taillandier et al. 2003, Minnaard et al. 2005, Vazeille et al. 2008) which allowed a muscle mass recovery over time after reloading. We have shown that during aging unloading-induced-atrophy was also due to an increased ubiquitin-proteasome-dependent proteolysis and apoptosis in skeletal muscle, but the lack of muscle mass recovery we recorded was not due to a sustained activation of these pathways after reloading as they were rapidly normalized during the recovery period. Moreover, some authors suggested that muscle unloading could lead to an "anabolic resistance" or a blunted protein response to nutrients (Glover et al. 2008, Phillips et al. 2009; Rennie et al. 2010). If muscle protein synthesis seems to be reduced after an immobilization period in elderly people (Kortebein et al. 2007) no data on muscle protein synthesis during recovery are available. Following immobilization, we have hypothesized an alteration in the response of muscle protein synthesis to explain the absence of a positive nitrogen balance and subsequently the lack of recovery of muscle mass we observed during aging. Our previous work strongly suggested that protein synthesis could be impaired during the recovery period (Magne et al. 2011).

It is now well established that feeding is a robust stimulator of muscle protein synthesis (Kimball et al. 2000). However, it is also well known that the stimulating effect of food intake on muscle anabolism is already less efficient in both old animals and elderly humans and this without any pathologies or physical inactivity (reviewed in Balage & Dardevet 2010). These alterations of muscle protein synthesis response have been partially explained by the presence of a low grade inflammation and/or oxidative stress development with age (Marzani et al. 2008, Rieu et al. 2009). Interestingly, we and others have previously shown that immobilization generated a further increase in the intramuscular inflammatory and oxidative stress markers (Kondo et al. 1991, Biolo et al. 2008, Magne et al. 2011) which could further alter protein synthesis response to food intake and then contribute to the total lack of muscle mass recovery during elderly after reloading. Then, during the recovery period, the postprandial phase should play a critical role since it is during this period that the major anabolic factors regarding protein metabolism are elevated following food intake. Amino acids and particularly leucine play

tel-00719700, version 1 - 20 Jul 2012

an important role in the stimulation of post-prandial muscle protein synthesis (Anthony et al. 1999-2002, Koopman et al. 2005). Leucine is known as a "nutrient signal" as it reduces muscle protein breakdown and further stimulates muscle protein synthesis (Buse & Reid 1975, Frexes-Steed et al. 1992, Crozier et al. 2005) and particularly during aging (Dardevet et al. 2002, Katsanos et al. 2006, Combaret et al. 2005, Rieu et al. 2003-2006-2007). The "leucine signal" stimulates the mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway, 70-kDa ribosomal protein S6 kinase (p70S6 kinase) activity, and enhances eiF4E-binding protein (4EBP1) phosphorylation and the association of eukaryotic initiative factor 4E (iIF4E) with eukaryotic initiative factor 4G (eiF4G) both *in vitro* and *in vivo* (Dardevet et al. 2000, Anthony et al. 2000, Bolster et al. 2004). These signaling pathways are known to become resistant to amino acid (i.e leucine) stimulation in case of chronic inflammation or oxidative stress (Lang et al. 2002, Marzani et al. 2008, Balage et al. 2009), phenomenons that occurred during immobilization in aged muscle (Magne et al. 2011). We hypothesized that following immobilization, a sustained resistance of muscle protein synthesis to leucine persisted and that increasing leucine intake could have an effect on muscle mass recovery by positiving the nitrogen balance after reloading. To our knowledge, no study tested yet such supplementation in aged muscle recovering from immobilization. Aims of this study were to 1/ determine if muscle protein synthesis is altered during atrophy following immobilization and resistant to protein intake stimulation during the subsequent recovery, and 2/ test the effect of a leucine supplementation on muscle mass recovery by measuring muscle protein synthesis, proteolysis and signaling proteins associated with these pathways at both the postabsorptive and postprandial states.

MATERIALS AND METHODS

Animals and experimental design

All procedures were performed in accordance with institutional guidelines on animal experimentation in France and comply with the policies and regulations of *The Journal of Physiology* given by Drummond (2009). Male Wistar rats aged 22-24 months were housed individually under controlled environmental conditions (room temperature 22°C; 12 h light-dark cycle, light period starting at 08:00 h), fed *ad libitum* a standard 13% casein diet **(Table 1)** and given free access to water.

After a 3-week adaptation period, 143 rats were anesthetized with isoflurane inhalation and subjected to unilateral hindlimb cast immobilization with an Orfit-soft plaque (Gibaud, France) for 8 days (I8). The foot was positioned in plantar extension to

tel-00719700, version 1 - 20 Jul 2012

induce maximal atrophy of the *gastrocnemius* muscle (Goldspink, 1977, Booth, 1982, Krawiec et al. 2005, Vazeille et al. 2008, Magne et al. 2011). For muscle recovery studies, casts were removed and animals were allowed to recover for 10 (R10), 20 (R20), 30 (R30) or 40 (R40) days. All rats were fed the standard 13% casein diet during immobilization. Then half of the animals were fed a control diet (CAS + ALA) and constituted the CONTROL group; the other half a 4.45% leucine-supplemented diet (CAS + LEU) and were the LEU group **(Table 1)**. The CAS + LEU diet was supplemented with leucine to increase plasma leucine concentration. To prevent the fall of plasma valine and isoleucine concentrations induced by leucine supplementation, the CAS + LEU diet was also supplemented with appropriate amounts of these amino acids. Alanine, an amino acid that has no effect on muscle protein metabolism, was included in the control CAS + ALA diet to render the diets isonitrogenous.

Casted rats reduced their food intake during the immobilization period. Therefore, 39 control non-casted rats were pair-fed (PF) to the casted group (18 at I8 and 21 at R20). 17 rats were studied as a reference point before the immobilization period (I0).

Before immobilization (I0) and at the end of the immobilization (I8) or recovery periods (R10, R20, R30, R40), animals were euthanized under pentobarbital sodium anaesthesia (50 mg/kg ip). On the morning of each time point for casted rats, half of the rats in each diet group were not fed, so that they were in a postabsorptive state. These rats were designed "PA" (PA CONTROL and PA LEU). The others ate as usual for 1h and then were at the postprandial state; they were named "group PP" (PP CONTROL and PP LEU). Non-casted pair-fed rats were also studied at the PA and the PP states using the same procedure (PA standard diet and PP standard diet).

Measurements of in vivo protein synthesis

Protein synthesis rates were measured using the flooding-dose method. Each rat was injected intravenously with [1-^{13}C] valine (99%) (150 µM/100 g body), 40 min before killing (i.e., 110-140 min after the beginning of the experimental diets), to flood the precursor pool with [1-^{13}C] valine. Rats were then euthanized under pentobarbital sodium anaesthesia (50 mg/kg ip). Blood was withdraw for the aorta, and hindlimb *gastrocnemius* muscles were carefully dissected, weighed and frozen in liquid nitrogen.

Free and bound valine enrichments were determined as follows. Muscles were powdered in liquid nitrogen in a ball mill (Dangoumeau, Prolabo, Paris, France). A 200 mg-aliquot of frozen muscle powder was homogenized in 2mL of 10% trichloroacetic acid

tel-00719700, version 1 - 20 Jul 2012

(TCA). Homogenates were centrifuged (8000 rpm, 15 min, 4°C) and supernatants, containing free amino acids, were desalted by cation-exchange chromotography (AG 50 x 8, 100–200 mesh, H+ form, Bio-Rad, Richmond, CA) in minidisposal columns. Valine and other amino acids were eluted with 4 mol/L NH_4OH. After evaporation of NH_4OH under vacuum, free amino acids were resuspended in 0.01 mol/L HCl for enrichment measurements. TCA-insoluble materials were washed in 4 volumes of cold 10% TCA and 3 times in 4 volumes of 0.2 mol/L perchloric acid (PCA). Resultant pellets were resuspended in 0.3 mol/L NaOH and incubated at 37°C for 1 h. Protein concentration was determined using the bicinchoninic procedure. Proteins were precipitated with 20% PCA overnight at 4°C, samples centrifuged (10,000 x *g*, 5 min, 4°C). The protein pellet was hydrolyzed in 6 mol/L HCl at 110°C for 24 h. HCl was removed by evaporation and amino acids purified by cation-exchange chromotography as described above. Measurement of free valine enrichment was done as its *t*-butyldimethylsilyl derivative by gas chromatography electron impact mass spectrometry, using a gas chromatograph coupled to an organic mass spectrometer quadrupole. Enrichment of [1-^{13}C] valine into muscle proteins was measured as its *N*-acetyl-propyl derivatives by gas chromatography–combustion-isotope ratio mass spectrometry.

Calculations

The absolute synthesis rate (ASR) was calculated from the product of the protein fractional synthesis rate (FSR) and the protein content of the tissue and expressed in mg/d. FSR (in %/d) is calculated from the formula : FSR = S*b* x 100/S*a* x *t*, were S*b* is the enrichment at time t (minus natural basal enrichment of protein) of the protein-bound valine, *t* is the incorporation time in d, and S*a* is the mean enrichment of free tissues valine between time 0 and *t*. The mean S*a* enrichment was the S*a* ($t_{1/2}$) value calculated from the linear regression obtained in tissue between time 0 and time *t*.

Measurement of proteasome activities

In this pathway, two distinct steps are depicted: 1/the ubiquitination of proteins and 2/their degradation by the 26S proteasome. We have firstly investigated the chrymotrypsin- and the trypsin-like activity of the proteasome.

One hundred and fifty mg of *gastrocnemius* muscle powder from pair-fed, non-immobilized and immobilized muscles at each time point were homogenized in 10 volumes of an ice-cold buffer containing 50 mM Tris-Cl (pH 7.5), 5mM $MgCl_2$, 250 mM

tel-00719700, version 1 - 20 Jul 2012

sucrose, 1 mM Dithiothreitol (DTT), 10 nM adenosine triphosphate (ATP) and protease inhibitors (10 µg/ml antipain, 10 µg/ml leupeptin, 10 µg/ml aprotinin, 10 µg/ml pepstatin A, 20 µM phenylmethanesulphonyl fluoride [PMSF]).

Briefly, extracts were centrifuged at 8320 rpm for 20 min at 4°C. Supernatants were then centrifuged at 47,000 rpm for 30min at 4°C and resulting supernatants were finally centrifuged at 47,000 rpm for 2.5 h at 4°C. The resulting protein pellets were resuspented in 150 µL of a buffer containing 20% glycerol, 5mM $MgCl_2$ and 50 mM Tris-Cl (pH 7.5) (Buffer A). Protein concentration was determined on these resuspented pellets according to Lowry et *al*. (1951). The peptidase activities of the proteasome (chymotrypsin-like and trypsin-like activities) were determined by measuring the hydrolysis of the fluorogenic substrates succinyl-Leu-Leu-Val-Tyr-7-amido-4-methylcoumarin (LLVY-AMC) (Sigma, USA) and the Boc-Leu-Arg-Arg-7-amido-4-methylcoumarin (LRR-AMC) (Enzo Life Sciences) respectively. To measure the proteasome chymotrypsin-like and trypsin-like activities, 15 µg of proteins from the resuspended pellets diluted in 15 µL of Buffer A were added to 60 µl of medium containing 50 mM Tris-Cl (pH 7.5), 11.25 mM $MgCL_2$, 1.25 mM DTT, 0.01 U apyrase and 300 µM LLVY-AMC or 800 µM LRR-AMC. Pilot experiments were performed with or without inhibitors of the chymotrypsin-like activity (MG132, Affiniti) to ensure that the activities were totally inhibited. The trypsin-like activity was measured with and without the specific inhibitor lactacystin (lactacystin, 100 µM, Sigma). Both activities were determined by measuring the accumulation of the fluorogenic cleavage product (AMC) using a luminescence spectrometer FLX800 (Biotek, USA) during 45 min at 380-nm excitation wavelength and 440-nm emission wavelength. The time course for the accumulation of AMC after hydrolysis of the substrate was analyzed by linear regression to calculate activities, i.e., the slopes of best fit of accumulation AMC *vs* time.

Analysis of muscle protein synthesis and proteolysis signalling pathways by western blotting

Powder (300 mg) of *gastrocnemius* muscles was homogenized in 10 volumes of a buffer containing 1 mM dithiothreitol (DTT), 0.1 mM phenylmethanesulphonyl fluoride (PMSF), 1 mM benzamidine and 0.5 mM Na vanadate. Extracts were then centrifugd at 9,500 rpm for 12 min at 4°C. Aliquots of supernatants were diluted in sample buffer, boiled for 5 min, and stored at −20°C until protein immunoblot analyses. Equal amounts of

tel-00719700, version 1 - 20 Jul 2012

proteins were separated by SDS–PAGE and transferred to PVDF membranes (GE Healthcare, Orsay, France).

Muscle proteasome proteolysis pathway

To explore the first step of the ubiquitine-proteasome-dependant proteolysis (tagging of proteins by ubiquitine before their recognition by the proteasome) the anti-ubiquitinylated proteins antibody, which recognizes poly-ubiquitin chains (Millipore, USA), was used at 1:2,000 dilution. Twenty-five micrograms of proteins was separated on 7% acrylamide gels. FoxO3a is a transcription factor involved in atrogenes transcription. When phosphorylated, its nuclear translocation is impossible. Thus, the ratio between FOXO3a and its phosphorylated form traduces an inhibition of atrogenes transcription.The abundance of transcription factor FoxO3a and its phosphorylated form phospho-FoxO3a (Ser253) were determined using appropriate antibodies (Cell Signalling Technology, Inc., Danvers, MA, USA) at 1:1,000 and 1:1,000 dilution respectively. Fifty micrograms of proteins was separated on 7.5% acrylamide gels.

Muscle protein synthesis pathway

Immunoblotting was performed using appropriate antibodies: S6 and phospho-S6 (Ser235/236) (Cell Signalling Technology, Inc., Danvers, MA, USA) at 1:6,000 and 1:6,000 dilution respectively. To determine the amount of S6 25µg of proteins were separated on 15% acrylamide gels, and 30 µg of proteins were separated on 12% acrylamide gels to quantify amount of phospho-S6.

Signals were detected using the ECL+ detection kit (GE Healthcare, France) after exposition onto radiographic film (Hyperfilm ECL, GE Healthcare, France) and quantified by densitometry using the Image J software. Signals were normalized against the signal obtained with a pool of samples used as reference.

Pilot experiment: Whey diet and High Protein diet supplementations

To improve our nutritional strategy after the free leucine supplementation, a pilot experiment was then realized. 41 animals were subjected to cast immobilization for 8 days and then allowed to recover during 20 (R20) and 40 (R40) days. Eight animals were euthanized at I8 and the others were divided in two groups: the first one (n=16) received a whey protein diet and the second one (n=17) received a high protein diet. Seven animals

tel-00719700, version 1 - 20 Jul 2012

were used as controle before casting (I0). All animals were studied at the post-prandial state.

Whey protein diet was composed (in g/ kg diet): 144 whey (PROLACTA®, LACTALIS ingredients), 5.7 proline, 30 colza oil, 3 sunflower oil, 27 peanut oil, 35 cellulose, 35 AIN93 mineral mix, 10 AIN93 vitamin mix, 2.5 cholin, 100 saccharose, 126 lactose and 482 wheat flour. High protein diet was composed (in g/ kg diet): 156 casein (LACTALIS ingredients), 144 whey (source=PROLACTA®, LACTALIS ingredients), 30 colza oil, 3 sunflower oil, 27 peanut oil, 35 cellulose, 35 AIN93 mineral mix, 10 AIN93 vitamin mix, 2.5 cholin, 100 saccharose, 124 lactose and 334 wheat flour.

Statistical analysis

All data are expressed as means ± SEM for n=17 (I0), n=18 (I8 PF), n=16 (I8), n=32 (R10), n=21 (R20PF), n=32 (R20), n=35 (R30) and n=28 (R40). Food intake and body weight comparisons were assessed using repeated measures analysis of variance test (StatView statistical software package, version 5, SAS Institute, Cary, NC, USA). Other measurements were analyzed using a two-way ANOVA. When significant differences were detected by ANOVA, *post hoc* comparisons between groups were made using the Fisher's PLSD test. Significance was defined at the $P<0.05$ level.

RESULTS

Animal characteristics

Food intake was 16.89 ± 0.42 g/d (I0) and decreased by 65% the first day of cast-immobilization **(Fig 1.A)**. Then, animals increased their food intake up to I8 (11.20 ± 0.32 and 11.19 ± 0.27 g/d in CONTROL and LEU group respectively). The nutritional intervention started the first day of the recovery period (R1). Food intake was similar in the two groups during the whole recovery period **(Fig. 1A)**.

Casted rats exhibited a slight decrease of body weight during immobilization (-8.6% at I8). Decrease of body weight continued during the recovery period whether the CONTROL diet or the LEU diet (-18.8 and -18.9% in CONTROL and LEU group respectively at I8) **(Fig. 1B)**.

tel-00719700, version 1 - 20 Jul 2012

tel-00719700, version 1 - 20 Jul 2012

Gastrocnemius muscle mass during immobilization and recovery

Immobilized *gastrocnemius* muscles atrophied by 20% at I8 (2,553 ± 0,042g at I0 and 2,013 ± 0,059g at I8, P<0.05) **(Fig. 2)**. The leucine supplementation, started after reloading and did not have any effect on muscle mass as muscle mass recovery was absent and muscle mass were similar at R40 between the two groups (2,012 ± 0,053g and 1,963 ± 0,059g in the CONTROL group and the LEU group respectively).

Effect of the leucine supplemented-diet on ubiquitin-proteasome-dependent pathways

Figure 3A shows an increased of the amount of polyUb conjugates at I8 (+70%, P<0.05 vs. I0). No effect of the diet was observed during the recovery period. Both chrymotrypsin- **(Fig. 3B)** and trypsin-like activity **(Fig. 3C)** were increased at I8 (+42 and +27% respectively, P<0.05 vs. I0). Both activities were still elevated at R10 within the CONTROL group and largely decreased within LEU group (~ -18% and ~ -30% for chrymotrypsin- and trypsin-like activity respectively, P<0.05, CONTROL group vs. LEU group). Activities were then normalized between the two groups. P-FOXO3a/FOXO3a ratio was not different between the two diets until R20. At R30, the ratio was largely increased in the LEU group (+80%, P<0.05 vs. CONTROL group) **(Fig. 3D)**.

Effect of the leucine supplemented-diet on protein synthesis and protein synthesis pathway

Immobilization does not induce any modifications on the ASR at the PA state but largely decreased protein synthesis at the PP state (-28% at I8, P<0.05 vs. I0) **(Fig 4A-B)**. The leucine supplementation started after cast removal and rapidly induced a higher ASR than within the CONTROL diet (+15% at R10 and +19% at R20, vs. CONTROL group) **(Fig 4B)**. No effect of leucine was recorded on protein synthesis at the PA state **(Fig. 4A)**.

The amount of protein S6 phosphorylated is normally increased with the PA/PP transition traducing an activation of the protein synthesis pathway. In the CONTROL group this increase was only present at R10 and R20 (+30% and +24 respectively, P<0.05 PA vs. PP) **(Fig 4C)**. In the LEU group this increase was present during the whole recovery period, from R10 to R40 with a peak at R30 (+30%, P<0.05 PA vs. PP) **(Fig 4D)**.

At I0, before immobilization, ASR increased by 15.5% after food intake (P<0.05 PA vs. PP). However at I8, the stimulatory effect of food intake deseaperd as ASR was no different between the PA and the PP states (13.10± 1.14 and 12.13±0.72mg/d at the PA and the PP states respectively) (**Fig. 4E**).

tel-00719700, version 1 - 20 Jul 2012

Parameters in the non immobilized leg of casted animals

The controlateral non immobilized leg of casted rats showed no modification in ubiquitine-proteasome-dependant proteolysis pathway (data non shown). The leucine supplementation had no effect on ASR at the PA state **(Fig 5A)** but induced a greater ASR at the PP state **(Fig 5B)** (+19 and +24% at R20 and R30 respectively, P<0.05 LEU *vs.* CONTROL group). Conversely, the increased amount of P-S6 protein, only present at R10 at the PA state in the CONTROL group **(Fig 5C)** was improved during the whole recovery period in the LEU group **(Fig 5D)** (+45 and + 91% at R10 and R30 respectively, P<0.05 PP *vs.* PA).

Parameters of non-casted pair-fed animals

Food intake of the pair-fed group perfectly matched the one of the casted group during immobilization (11.29 ± 0.06 g/d at I8) and recovery (17.86 ± 1.09 g/d at R20). The body weight of pair-fed animals was not different from the others during the whole experiment. As a result, *gastrocnemius* muscle mass from these rats were stable at each point measured (2,498 ± 0,038g at R20 *vs.* 2,553 ± 0,042g at I8). Except the amount of polyUb conjugates which slightly increased at I8 compared to I0 (+30%, P<0.05 using a Student's *t*-test I8 *vs.* I0), before returning to I0 value, all the others parameters did not change from I0 to the end of the recovery period.

Effect of Whey diet and High Protein diet supplementations on muscle mass recovery

Figure 6 shows the muscle mass gain compared to the muscle mass at I8. Seven hundreds mg of muscle were loss during the immobilization period. No muscle mass gain was obtained after 40 days in the CONTROL or the LEU groups. However, within the WHEY and HIGH PROTEIN groups, a progressive muscle mass recovery appeared as soon as 20 days after cast removal, to achieve ~400mg at R40. At R20, the muscle mass gain was ~300 mg within the WHEY group and only ~200 within the HIGH PROTEIN group (P<0.05 *vs.* I8).

DISCUSSION

In this study, we have demonstrated that during ageing, muscle protein synthesis in was depressed at the postprandial state by disuse period and only normalized during reloading. As proteolysis was also only normalized during the recovery period, the resultant nitrogen balance was then not enough positive as required for the muscle protein

gain, hence contributing to the age-related incomplete muscle mass recoveries. By contrast to high protein or whey protein diets, we also demonstrated that a dietary free leucine supplementation had no effect on muscle mass gain despite its positive stimulating effect on muscle protein metabolism during the recovery period.

Sarcopenia is the progressive loss of muscle mass and strength related to normal aging (Rosenberg, 1989, Cruz-Jentoft et al. 2010). One of the mechanisms leading to this muscle mass loss could be the impaired muscle mass recovery following acute catabolic states observed in aged animals (Mosoni et al. 1995; Dardevet et al. 1995, Chakravarthy et al. 2000; Magne et al. 2011) or elderly humans (Suetta et al. 2009). This was recently named "the catabolic crisis model" by English & Paddon-Jones (English & Paddon-Jones, 2010). At a cellular level, we have previously shown that an 8 day-immobilization period by casting induced an increase of muscle proteolysis i.e activation of the ubiquitin-proteasome-dependent pathway (Magne et al. 2011). We have completed these observations by showing in the present study, a large depression of the protein synthesis at the postprandial state which explained a large imbalance of the protein metabolism leading to the protein loss and ultimately muscle mass loss. During the reloading, as the nitrogen balance was only equilibrated by a normalization of the protein breakdown and only a slight increase of the protein synthesis, there was no effective positive nitrogen balance that is normally required to recover muscle mass. Immobilized muscles exhibited a decrease in responsiveness of muscle protein synthesis to anabolic stimuli (i.e. amino acids or insulin). These observations are in agreement with others studies which have suggested that immobilization could induce an "anabolic resistance" of muscle protein synthesis to amino acids in adult (Glover et al. 2008; Phillips et al. 2009; Rennie et al. 2010). If this impaired response of the protein synthesis has already been observed following immobilization in adult (Ferrando et al. 1996; Paddon-Jones et al. 2006; de Boer et al. 2007; Glover et al. 2008) it is the first study to demonstrate this "anabolic resistance" during reloading and ageing. This alteration of the protein synthesis pathway could be a resultant of the presence of an inflammation during immobilization (Zarzhevsky et al. 2001; Magne et al. 2011). Indeed, several studies of our laboratory and others have shown an association between the pro-inflammatory markers related to ageing and a decrease of protein synthesis in humans (Toth et al. 2005) and an impaired postprandial stimulation of muscle protein synthesis in old rats (Lang et al. 2002; Balage et al. 2009). Moreover, oxidative stress present during immobilization (Magne et al. 2011) could induce damages at the cellular and tissue levels and impair the protein anabolic response (Marzani et al.

tel-00719700, version 1 - 20 Jul 2012

2008). We an others previously shown that using anti-inflammatory and antioxidant compounds could have a positive effect on muscle mass recovery during ageing (Marzani et al. 2008; Rieu et al. 2009) or immobilization in adult animals (Kondo et al. 1993; Vazeille et al. 2011) by suppressing the proteolytic pathways or the induction of some signalling pathways (i.e., nuclear factor κB). However, anti-inflammatory compounds should be used carefully as the presence of a low-grade inflammation is needed to induce efficient muscle regeneration (Miller et al. 2000; Tidball & Wehling-Henricks 2007). Thus, You et al. have shown that omega-3 fatty acids supplementation (which are known to have anti-inflammatory properties) during immobilization and subsequent recovery worsens the atrophy in adult animals (You et al. 2010). In this study, the authors showed that omega-3 fatty acids supplementation inhibited muscle recovery by suppressing the activation of Akt–p70s6k signalling.

The stimulation of muscle protein synthesis is particularly important during the postprandial phase since it is during this period that protein gain is possible. To generate the positive nitrogen balance required for protein accretion during recovery, a normalization of changes in protein metabolism is required but also an increased protein synthesis, decreased proteolysis, or simultaneous changes in both processes. If exercise is the best way to induce theses modifications to initiate muscle mass gain, it is not always possible particularly after prolonged immobilization periods in elderly people. Thus, as feeding is a robust stimulator of muscle protein synthesis (Kimball et al. 2000) we focused our work on nutritional supports. Amino acids and particularly leucine have been shown to be efficient in the stimulation of postprandial muscle protein synthesis (Anthony et al. 1999-2002, Koopman et al. 2005). Some studies have used a mix of branched amino acids during immobilization period (Stein et al. 1999; Paddon-Jones et al. 2004; Trappe et al. 2007) but few studies have evaluated the isolated effect of leucine supplementation on muscle mass recovery after disuse situations. In 2010, Baptista et al. supplemented diets with free leucine and shown that these diets given during immobilization could attenuate the muscle mass atrophy (Baptista et al., 2010). Up to now, no study has explored its potential effect during the reloading in adult or aged animals or humans. This study was conducted to test the effect of a free leucine supplementation which is also known to stimulate protein synthesis by activating specific kinases implicated in pathways involved in the regulation of translation initiation, particularly during aging (Dardevet et al. 2002; Katsanos et al. 2006, Combaret et al. 2005; Rieu et al. 2003, 2006, 2007). Its action on protein metabolism by stimulating the m-TOR pathway has been well demonstrated

tel-00719700, version 1 - 20 Jul 2012

(Dardevet et al. 2000; Anthony et al. 2000; Bolster et al. 2004) and leucine effect could be maintained when administrated chronically (Lynch et al. 2002; Rieu et al. 2003). For the first time, in our study, a free leucine supplemented diet given during rehabilitation had a positive effect on the muscle protein synthesis and the protein breakdown i.e. the protein synthesis was higher at the postprandial state with leucine and proteolysis was normalized earlier. However, surprisingly, it failed in the muscle mass recovery.

Our measures of muscle protein synthesis confirmed that our free leucine supplementation was still efficient 150 to 180 min after food intake. As muscle mass gain was absent, we hypothesized that the stimulation of protein synthesis was nevertheless not sustained enough to translate into a significant muscle protein accretion. It may be postulated that free leucine, as it is absorbed fast, induced a stimulating "leucine signal" on protein synthesis before the other amino acid availability. Indeed, the duration or the intensity of the "leucine signal" could have been insufficient. This desynchronization between the "leucine signal" and the availability of substrates for protein synthesis could explain the insufficient positive nitrogen balance and the lack of protein accretion. To verify this hypothesis we improved our nutritional strategy by resynchronizing both the "leucine signal" and the amino acids availability. The strategy was 1/ to change the quality of proteins to use rich-leucine and fast digested proteins to induce both the "leucine signal" and a large increase of amino acids concentration at the same time and 2/ to increase the quantity of proteins to provide amino acids for a longer time during the postprandial state . We used whey proteins (i.e. rich-leucine and fast digested proteins) and high protein diet (i.e. casein and whey proteins) respectively. Indeed, whey proteins are known to be digested faster than caseins i.e. they have a rapid absorption kinetic, but also a high leucine content (Boirie et al. 1997, Dangin et al. 2001-2003) and whey proteins have already demonstrated their positive effect in re-stimulating muscle protein accretion in defective protein synthesis stimulation during aging (Pennings et al. 2011). Concerning high protein diet, composed by a half of caseins and the other half by whey proteins, they combine the property of whey (i.e. rich-leucine and fast digested proteins) and mass effect (high quantity of amino acids on the long time, Boirie et al. 1997). The two diets had a positive impact on muscle mass gain, inducing a gain of ~60% of the total muscle mass loss. However, the potential longer stimulation of protein synthesis during the postprandial state remained to be verified.

The current study was the first to demonstrate an "anabolic resistance" of protein synthesis to amino acids during rehabilitation following immobilization-induced atrophy

tel-00719700, version 1 - 20 Jul 2012

during aging. Meal supplemented with free leucine produced no effect on muscle mass gain despite it induced a greater post-prandial protein synthesis response. We conclude that during aging and immobilization there was a desynchronization between the "leucine signal" and the availability of substrates for protein synthesis. Moreover, we demonstrated here for the first time that muscle protein accretion after immobilization-induced atrophy could be nevertheless obtained with whey protein or high protein diets. These data are important to develop nutritional strategies to induce muscle mass recovery following atrophy in elderlies.

REFERENCES

Anthony JC, Anthony TG & Layman DK. (1999). Leucine supplementation enhances skeletal muscle recovery in rats following exercise. *The Journal of nutrition* **129,** 1102-1106.

Anthony TG, Anthony JC, Yoshizawa F, Kimball SR & Jefferson LS. (2001). Oral administration of leucine stimulates ribosomal protein mRNA translation but not global rates of protein synthesis in the liver of rats. *The Journal of nutrition* **131,** 1171-1176.

Balage M & Dardevet D. (2010). Long-term effects of leucine supplementation on body composition. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care* **13,** 265-270.

Balage M, Averous J, Remond D, Bos C, Pujos-Guillot E, Papet I, Mosoni L, Combaret L & Dardevet D. (2009). Presence of low-grade inflammation impaired postprandial stimulation of muscle protein synthesis in old rats. *The Journal of nutritional biochemistry* **21,** 325-331.

Baptista IL, Leal ML, Artioli GG, Aoki MS, Fiamoncini J, Turri AO, Curi R, Miyabara EH & Moriscot AS. (2010). Leucine attenuates skeletal muscle wasting via inhibition of ubiquitin ligases. *Muscle & nerve* **41,** 800-808.

Biolo G, Agostini F, Simunic B, Sturma M, Torelli L, Preiser JC, Deby-Dupont G, Magni P, Strollo F, di Prampero P, Guarnieri G, Mekjavic IB, Pisot R & Narici MV. (2008). Positive energy balance is associated with accelerated muscle atrophy and increased

tel-00719700, version 1 - 20 Jul 2012

erythrocyte glutathione turnover during 5 wk of bed rest. *The American journal of clinical nutrition* **88,** 950-958.

Boirie Y, Gachon P & Beaufrere B. (1997). Splanchnic and whole-body leucine kinetics in young and elderly men. *The American journal of clinical nutrition* **65,** 489-495.

Bolster DR, Vary TC, Kimball SR & Jefferson LS. (2004). Leucine regulates translation initiation in rat skeletal muscle via enhanced eIF4G phosphorylation. *The Journal of nutrition* **134,** 1704-1710.

Booth FW. (1982). Effect of limb immobilization on skeletal muscle. *J Appl Physiol* **52,** 1113-1118.

Buse MG & Reid SS. (1975). Leucine. A possible regulator of protein turnover in muscle. *The Journal of clinical investigation* **56,** 1250-1261.

Chakravarthy MV, Davis BS & Booth FW. (2000). IGF-I restores satellite cell proliferative potential in immobilized old skeletal muscle. *J Appl Physiol* **89,** 1365-1379.

Combaret L, Dardevet D, Rieu I, Pouch MN, Bechet D, Taillandier D, Grizard J & Attaix D. (2005). A leucine-supplemented diet restores the defective postprandial inhibition of proteasome-dependent proteolysis in aged rat skeletal muscle. *The Journal of physiology* **569,** 489-499.

Crozier SJ, Kimball SR, Emmert SW, Anthony JC & Jefferson LS. (2005). Oral leucine administration stimulates protein synthesis in rat skeletal muscle. *The Journal of nutrition* **135,** 376-382.

Cruz-Jentoft AJ, Baeyens JP, Bauer JM, Boirie Y, Cederholm T, Landi F, Martin FC, Michel JP, Rolland Y, Schneider SM, Topinkova E, Vandewoude M & Zamboni M. (2010). Sarcopenia: European consensus on definition and diagnosis: Report of the European Working Group on Sarcopenia in Older People. *Age and ageing* **39,** 412-423.

tel-00719700, version 1 - 20 Jul 2012

tel-00719700, version 1 - 20 Jul 2012

Dangin M, Boirie Y, Garcia-Rodenas C, Gachon P, Fauquant J, Callier P, Ballevre O & Beaufrere B. (2001). The digestion rate of protein is an independent regulating factor of postprandial protein retention. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **280,** E340-348.

Dangin M, Guillet C, Garcia-Rodenas C, Gachon P, Bouteloup-Demange C, Reiffers-Magnani K, Fauquant J, Ballevre O & Beaufrere B. (2003). The rate of protein digestion affects protein gain differently during aging in humans. *The Journal of physiology* **549,** 635-644.

Dardevet D, Sornet C, Balage M & Grizard J. (2000). Stimulation of in vitro rat muscle protein synthesis by leucine decreases with age. *The Journal of nutrition* **130,** 2630-2635.

Dardevet D, Sornet C, Bayle G, Prugnaud J, Pouyet C & Grizard J. (2002). Postprandial stimulation of muscle protein synthesis in old rats can be restored by a leucine-supplemented meal. *The Journal of nutrition* **132,** 95-100.

Dardevet D, Sornet C, Taillandier D, Savary I, Attaix D & Grizard J. (1995). Sensitivity and protein turnover response to glucocorticoids are different in skeletal muscle from adult and old rats. Lack of regulation of the ubiquitin-proteasome proteolytic pathway in aging. *The Journal of clinical investigation* **96,** 2113-2119.

de Boer MD, Selby A, Atherton P, Smith K, Seynnes OR, Maganaris CN, Maffulli N, Movin T, Narici MV & Rennie MJ. (2007). The temporal responses of protein synthesis, gene expression and cell signalling in human quadriceps muscle and patellar tendon to disuse. *The Journal of physiology* **585,** 241-251.

Drummond GB. (2009). Reporting ethical matters in the Journal of Physiology: standards and advice. *The Journal of physiology* **587,** 713-719.

English KL & Paddon-Jones D. (2010). Protecting muscle mass and function in older adults during bed rest. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care* **13,** 34-39.

Ferrando AA, Lane HW, Stuart CA, Davis-Street J & Wolfe RR. (1996). Prolonged bed rest decreases skeletal muscle and whole body protein synthesis. *The American journal of physiology* **270,** E627-633.

Frexes-Steed M, Lacy DB, Collins J & Abumrad NN. (1992). Role of leucine and other amino acids in regulating protein metabolism in vivo. *The American journal of physiology* **262,** E925-935.

Gibson JN, Halliday D, Morrison WL, Stoward PJ, Hornsby GA, Watt PW, Murdoch G & Rennie MJ. (1987). Decrease in human quadriceps muscle protein turnover consequent upon leg immobilization. *Clin Sci (Lond)* **72,** 503-509.

Glover EI, Phillips SM, Oates BR, Tang JE, Tarnopolsky MA, Selby A, Smith K & Rennie MJ. (2008). Immobilization induces anabolic resistance in human myofibrillar protein synthesis with low and high dose amino acid infusion. *The Journal of physiology* **586,** 6049-6061.

Goldspink DF. (1977). The influence of immobilization and stretch on protein turnover of rat skeletal muscle. *The Journal of physiology* **264,** 267-282.

Harris T. (1997). Muscle mass and strength: relation to function in population studies. *The Journal of nutrition* **127,** 1004S-1006S.

Katsanos CS, Kobayashi H, Sheffield-Moore M, Aarsland A & Wolfe RR. (2006). A high proportion of leucine is required for optimal stimulation of the rate of muscle protein synthesis by essential amino acids in the elderly. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **291,** E381-387.

Kimball SR, Jefferson LS, Nguyen HV, Suryawan A, Bush JA & Davis TA. (2000). Feeding stimulates protein synthesis in muscle and liver of neonatal pigs through an mTOR-dependent process. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **279,** E1080-1087.

Kondo H, Kodama J, Kishibe T & Itokawa Y. (1993). Oxidative stress during recovery from muscle atrophy. *FEBS letters* **326,** 189-191.

tel-00719700, version 1 - 20 Jul 2012

Kondo H, Miura M & Itokawa Y. (1991). Oxidative stress in skeletal muscle atrophied by immobilization. *Acta Physiol Scand* **142,** 527-528.

Koopman R, Wagenmakers AJ, Manders RJ, Zorenc AH, Senden JM, Gorselink M, Keizer HA & van Loon LJ. (2005). Combined ingestion of protein and free leucine with carbohydrate increases postexercise muscle protein synthesis in vivo in male subjects. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **288,** E645-653.

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.

Krawiec BJ, Frost RA, Vary TC, Jefferson LS & Lang CH. (2005). Hindlimb casting decreases muscle mass in part by proteasome-dependent proteolysis but independent of protein synthesis. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **289,** E969-980.

Lang CH, Frost RA, Nairn AC, MacLean DA & Vary TC. (2002). TNF-alpha impairs heart and skeletal muscle protein synthesis by altering translation initiation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **282,** E336-347.

Lawler JM, Song W & Demaree SR. (2003). Hindlimb unloading increases oxidative stress and disrupts antioxidant capacity in skeletal muscle. *Free radical biology & medicine* **35,** 9-16.

Loughna P, Goldspink G & Goldspink DF. (1986). Effect of inactivity and passive stretch on protein turnover in phasic and postural rat muscles. *J Appl Physiol* **61,** 173-179.

Magne H, Savary-Auzeloux I, Vazeille E, Claustre A, Attaix D, Anne L, Veronique SL, Philippe G, Dardevet D & Combaret L. (2011). Lack of muscle recovery after immobilization in old rats does not result from a defect in normalization of the ubiquitin-proteasome and the caspase-dependent apoptotic pathways. *The Journal of physiology* **589,** 511-524.

tel-00719700, version 1 - 20 Jul 2012

tel-00719700, version 1 - 20 Jul 2012

Marzani B, Balage M, Venien A, Astruc T, Papet I, Dardevet D & Mosoni L. (2008). Antioxidant supplementation restores defective leucine stimulation of protein synthesis in skeletal muscle from old rats. *The Journal of nutrition* **138,** 2205-2211.

Minnaard R, Wagenmakers AJ, Combaret L, Attaix D, Drost MR, van Kranenburg GP, Schaart G & Hesselink MK. (2005). Ubiquitin-proteasome-dependent proteolytic activity remains elevated after zymosan-induced sepsis in rats while muscle mass recovers. *The international journal of biochemistry & cell biology* **37,** 2217-2225.

Mosoni L, Valluy MC, Serrurier B, Prugnaud J, Obled C, Guezennec CY & Mirand PP. (1995). Altered response of protein synthesis to nutritional state and endurance training in old rats. *The American journal of physiology* **268,** E328-335.

Paddon-Jones D, Sheffield-Moore M, Katsanos CS, Zhang XJ & Wolfe RR. (2006). Differential stimulation of muscle protein synthesis in elderly humans following isocaloric ingestion of amino acids or whey protein. *Experimental gerontology* **41,** 215-219.

Pennings B, Boirie Y, Senden JM, Gijsen AP, Kuipers H & van Loon LJ. (2011). Whey protein stimulates postprandial muscle protein accretion more effectively than do casein and casein hydrolysate in older men. *The American journal of clinical nutrition* **93,** 997-1005.

Phillips SM, Glover EI & Rennie MJ. (2009). Alterations of protein turnover underlying disuse atrophy in human skeletal muscle. *J Appl Physiol* **107,** 645-654.

Rennie MJ, Selby A, Atherton P, Smith K, Kumar V, Glover EL & Philips SM. (2010). Facts, noise and wishful thinking: muscle protein turnover in aging and human disuse atrophy. *Scandinavian journal of medicine & science in sports* **20,** 5-9.

Rieu I, Balage M, Sornet C, Debras E, Ripes S, Rochon-Bonhomme C, Pouyet C, Grizard J & Dardevet D. (2007). Increased availability of leucine with leucine-rich whey proteins improves postprandial muscle protein synthesis in aging rats. *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif* **23,** 323-331.

tel-00719700, version 1 - 20 Jul 2012

Rieu I, Balage M, Sornet C, Giraudet C, Pujos E, Grizard J, Mosoni L & Dardevet D. (2006). Leucine supplementation improves muscle protein synthesis in elderly men independently of hyperaminoacidaemia. *The Journal of physiology* **575,** 305-315.

Rieu I, Magne H, Savary-Auzeloux I, Averous J, Bos C, Peyron MA, Combaret L & Dardevet D. (2009). Reduction of low grade inflammation restores blunting of postprandial muscle anabolism and limits sarcopenia in old rats. *The Journal of physiology* **587,** 5483-5492.

Rieu I, Sornet C, Bayle G, Prugnaud J, Pouyet C, Balage M, Papet I, Grizard J & Dardevet D. (2003). Leucine-supplemented meal feeding for ten days beneficially affects postprandial muscle protein synthesis in old rats. *The Journal of nutrition* **133,** 1198-1205.

Rosenberg IH. (1989). Summary comments. *Am J Clin Nutr* **50,** 1231-1233.

Stein TP, Schluter MD, Leskiw MJ & Boden G. (1999). Attenuation of the protein wasting associated with bed rest by branched-chain amino acids. *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif* **15,** 656-660.

Suetta C, Hvid LG, Justesen L, Christensen U, Neergaard K, Simonsen L, Ortenblad N, Magnusson SP, Kjaer M & Aagaard P. (2009). Effects of aging on human skeletal muscle after immobilization and retraining. *J Appl Physiol* **107,** 1172-1180.

Taillandier D, Aurousseau E, Combaret L, Guezennec CY & Attaix D. (2003). Regulation of proteolysis during reloading of the unweighted soleus muscle. *The international journal of biochemistry & cell biology* **35,** 665-675.

Taillandier D, Aurousseau E, Meynial-Denis D, Bechet D, Ferrara M, Cottin P, Ducastaing A, Bigard X, Guezennec CY, Schmid HP & et al. (1996). Coordinate activation of lysosomal, Ca 2+-activated and ATP-ubiquitin-dependent proteinases in the unweighted rat soleus muscle. *The Biochemical journal* **316 (Pt 1),** 65-72.

Taillandier D, Bigard X, Desplanches D, Attaix D, Guezennec CY & Arnal M. (1993). Role of protein intake on protein synthesis and fiber distribution in the unweighted soleus muscle. *J Appl Physiol* **75,** 1226-1232.

Tidball JG & Wehling-Henricks M. (2007). Macrophages promote muscle membrane repair and muscle fibre growth and regeneration during modified muscle loading in mice in vivo. *The Journal of physiology* **578,** 327-336.

Tilignac T, Temparis S, Combaret L, Taillandier D, Pouch MN, Cervek M, Cardenas DM, Le Bricon T, Debiton E, Samuels SE, Madelmont JC & Attaix D. (2002). Chemotherapy inhibits skeletal muscle ubiquitin-proteasome-dependent proteolysis. *Cancer research* **62,** 2771-2777.

Toth MJ, Matthews DE, Tracy RP & Previs MJ. (2005). Age-related differences in skeletal muscle protein synthesis: relation to markers of immune activation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **288,** E883-891.

Trappe TA, Burd NA, Louis ES, Lee GA & Trappe SW. (2007). Influence of concurrent exercise or nutrition countermeasures on thigh and calf muscle size and function during 60 days of bed rest in women. *Acta physiologica (Oxford, England)* **191,** 147-159.

Vazeille E, Codran A, Claustre A, Averous J, Listrat A, Bechet D, Taillandier D, Dardevet D, Attaix D & Combaret L. (2008). The ubiquitin-proteasome and the mitochondria-associated apoptotic pathways are sequentially downregulated during recovery after immobilization-induced muscle atrophy. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **295,** E1181-1190.

Vazeille E, Slimani L, Claustre A, Magne H, Labas R, Bechet D, Taillandier D, Dardevet D, Astruc T, Attaix D & Combaret L. (2011). Curcumin treatment prevents increased proteasome and apoptosome activities in rat skeletal muscle during reloading and improves subsequent recovery. *The Journal of nutritional biochemistry*.

tel-00719700, version 1 - 20 Jul 2012

You JS, Park MN & Lee YS. (2010). Dietary fish oil inhibits the early stage of recovery of atrophied soleus muscle in rats via Akt-p70s6k signaling and PGF2alpha. *The Journal of nutritional biochemistry* **21,** 929-934.

Zarzhevsky N, Menashe O, Carmeli E, Stein H & Reznick AZ. (2001). Capacity for recovery and possible mechanisms in immobilization atrophy of young and old animals. *Annals of the New York Academy of Sciences* **928,** 212-225.

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank Arlette Cissoire and Philippe Lhoste from the IEN (INRA Clermont-Ferrand-Theix, France) for their excellent assistance during animal experimentations. We also thank, Claire Sornet for technical assistance and Hélène Lafarge for help in the management of the bibliography. This study was supported by grants from the Institut National de la Recherche Agronomique. HM was supported by a PhD fellowship from the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche.

tel-00719700, version 1 - 20 Jul 2012

Table 1: Composition of standard and experimental diets

Quantities are explained in g/kg dry matter.

[1] Alanine was included in the control CAS+ALA diet to render the diets isonitrogenous. This amino acid has no effect on muscle protein metabolism.

[2] Valine and isoleucine were included in the CAS+LEU diet to prevent the fall of their plasma concentrations induced by leucine supplementation.

CAS: casein; CAS+ALA: casein + alanine; CAS+LEU: casein + leucine.

tel-00719700, version 1 - 20 Jul 2012

tel-00719700, version 1 - 20 Jul 2012

Table 1: Composition of standard and experimental diets

	Standard diet	Control and experimental diets	
	CAS	CAS + ALA	CAS + LEU
Ingredient			
Casein	166	166	166
L-cystine	1.8	1,8	1,8
Alanine [1]	-	59	-
Leucine [2]	-	-	44.5
Valine [2]	-	-	5.1
Isoleucine	-	-	9.8
Colza oil	30	30	30
Peanut oil	27	27	27
Sunflower oli	3	3	3
Cellulose	35	35	35
Saccharose	100	100	100
Lactose	134	134	134
Wheat flour	458.2	399.2	398.8
Mineral mixture AIN93	35	35	35
Vitamins mixture AIN93	10	10	10
given during	*adaptation immobilization*	*recovery*	*recovery*

tel-00719700, version 1 - 20 Jul 2012

Figure 1: Food intake (A) and Body weight (B) of casted rats

Food intake and body weight of casted rats are similar during the whole experiment between the CONTROL and the LEU groups. IM: immobilization period. Data are means ± SEM.

Figure 2: Muscle mass of gastrocnemius after immobilization and after the nutritional supplementation

In immobilized muscles, muscle mass decreased after a 8-day-immobilization period. The nutritional supplementation started after cast removal but muscle mass was not different between the CONTROL group and the LEU group at R40 and never returned to its pre-immobilization value. IM: immobilization period; I0: before immobilization; I8: 8 days of casting; R10 to R40: 10 to 40 days of recovery. * $P<0.05$ using a Student's *t*-test, *vs.* I0. No significant difference between CONTROL and LEU groups were recorded. Data are means ± SEM.

Figure 3: Ubiquitin-proteasome-dependant proteolysis in immobilized gastrocnemius muscles before and after the nutritional intervention

(A) accumulation of polyubiquitinated polyconjugates was assessed on 25 µg of proteins by immunoblotting using an antibody that recognizes polyubiquitin chains. *B* and *C*, the chymotrypsin-like activity (*B*) and trypsin-like activity (*C*) of the proteasome were measured by using the fluorogenic substrate succinyl-LLVY-AMC and Boc-LRR-AMC as indicated in Methods. Data are expressed in relative fluorescent units (RFU/µg/min). (*D)* phospho-FOXO3a/FOXO3a ratio traduces an anti-proteolytic potential. FoxO3a and its phosphorylated form phospho-FoxO3a (Ser253) were determined using appropriate antibodies on 50 µg of proteins. IM: immobilization period; I0: before immobilization; I8: 8 days of casting; R10 to R40: 10 to 40 days of recovery. Data are means ± SEM. As no effect of the meal was observed, post-absortive and post-prandial values are pooled. * $P<0.05$ using a Student's *t*-test, *vs.* I0. Data are means ± SEM.

Figure 4: Muscle protein synthesis and protein pathway in immobilized gastrocnemius muscles before and after the nutritional intervention

Muscle protein synthesis at the post-absorptive *(A)* and the post-prandial states *(B)* is expressed as the absolute synthesis rate (ASR), i.e, the amount of proteins synthesized in mg/d. *C* and *D*, protein S6 phosphorylation in gastrocnemius is presented for the

CONTROL group (*C*) and the LEU group (*D*) at the post-absortive and the post-prandial states. The amount of protein S6 phosphorylated was assed by immunoblotting on 30 µg of proteins. *(E)* Anabolic resistance to food intake induced by immobilization. IM: immobilization period; I0: before immobilization; I8: 8 days of casting; R10 to R40: 10 to 40 days of recovery; PA: post-absorptive state; PP: post-prandial state. * $P<0.05$ using a Student's *t*-test, *vs.* I0. # $P<0.05$ using a Student's *t*-test, LEU group *vs.* CONTROL group. † $P<0.05$ using a Student's t-test, PA *vs.* PP. Data are means ± SEM.

Figure 5: Muscle protein synthesis in gastrocnemius non-immobilized muscles

Muscle protein synthesis was also assessed in the controlateral non-casted leg of rats at the post-absorptive *(A)* and the post-prandial states *(B)*. Data represented the absolute synthesis rate (ASR), i.e, the amount of proteins synthesized in mg/d. *C* and *D*, protein S6 phosphorylation in gastrocnemius is presented for the CONTROL group (*C*) and the LEU group (*D*) at the post-absortive and the post-prandial states. The amount of protein S6 phosphorylated was assed by immunoblotting on 30 µg of proteins. IM: immobilization period; I0: before immobilization; I8: 8 days of casting; R10 to R40: 10 to 40 days of recovery; PA: post-absorptive state; PP: post-prandial state. * $P<0.05$ using a Student's *t*-test, LEU *vs.* CONTROL group. † $P<0.05$ using a Student's *t*-test, PA *vs.* PP. Data are means ± SEM.

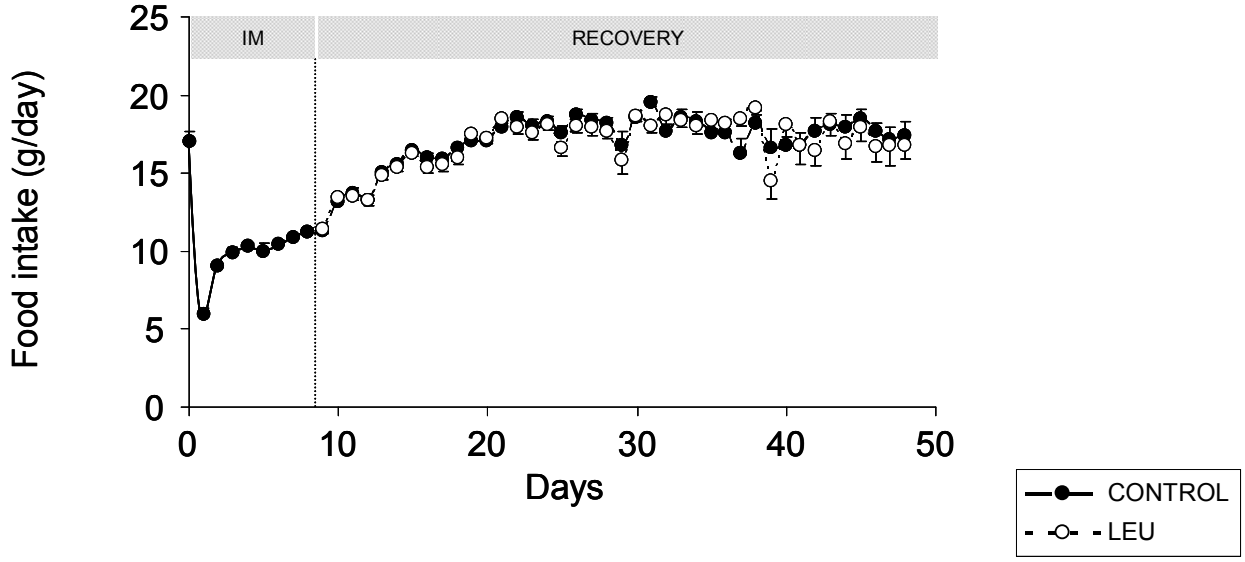
Figure 6: Muscle mass gain during the recovery period after the nutritional intervention

Muscle mass gain after the nutritional intervention is presented as the gain versus I8, in mg of muscle. Four diets were tested during the recovery period: a CONTROL diet (13% casein), a LEU diet (13% casein + 4.45% Leucine), a WHEY diet (13% whey i.e. leucine-rich and fast digested protein diet), a HIGH PROTEIN diet (13% casein + 13% whey). * $P<0.05$ using a Student's *t*-test, *vs.* I8. Data are means ± SEM.

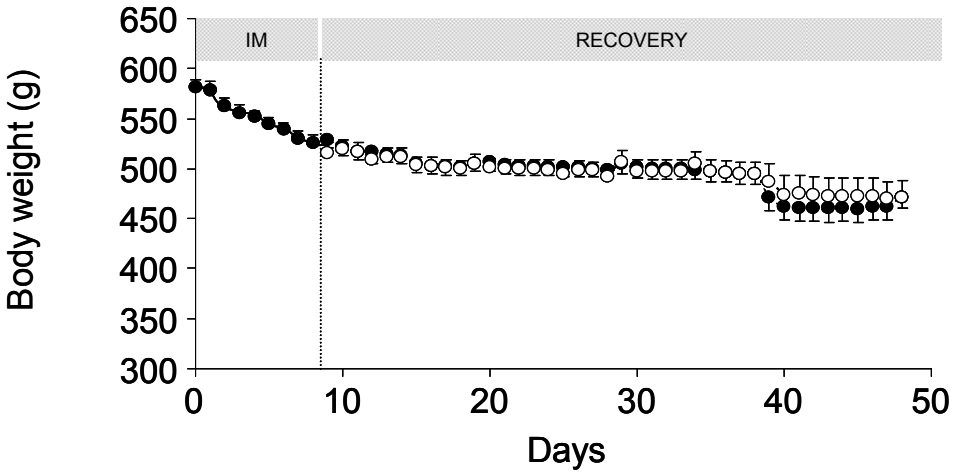
tel-00719700, version 1 - 20 Jul 2012

Figure 1: Food intake (A) and Body weight (B) of casted rats

A

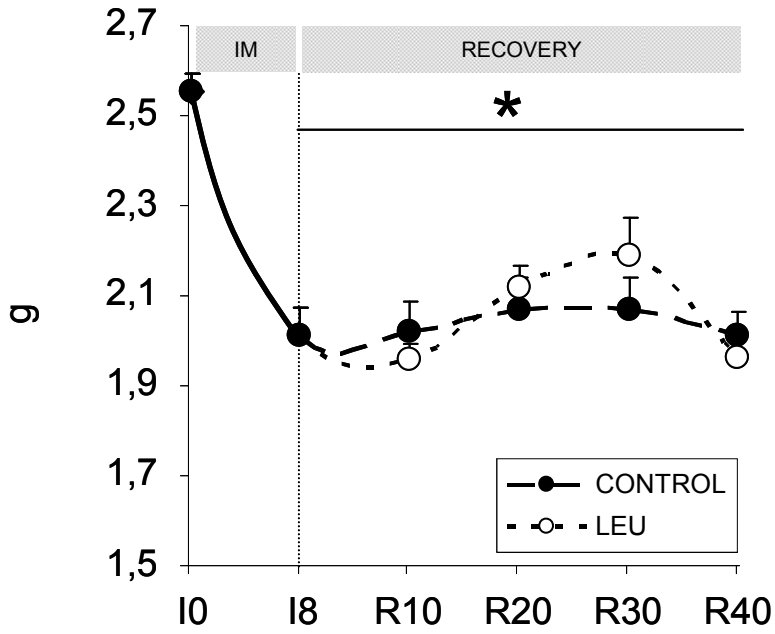


B



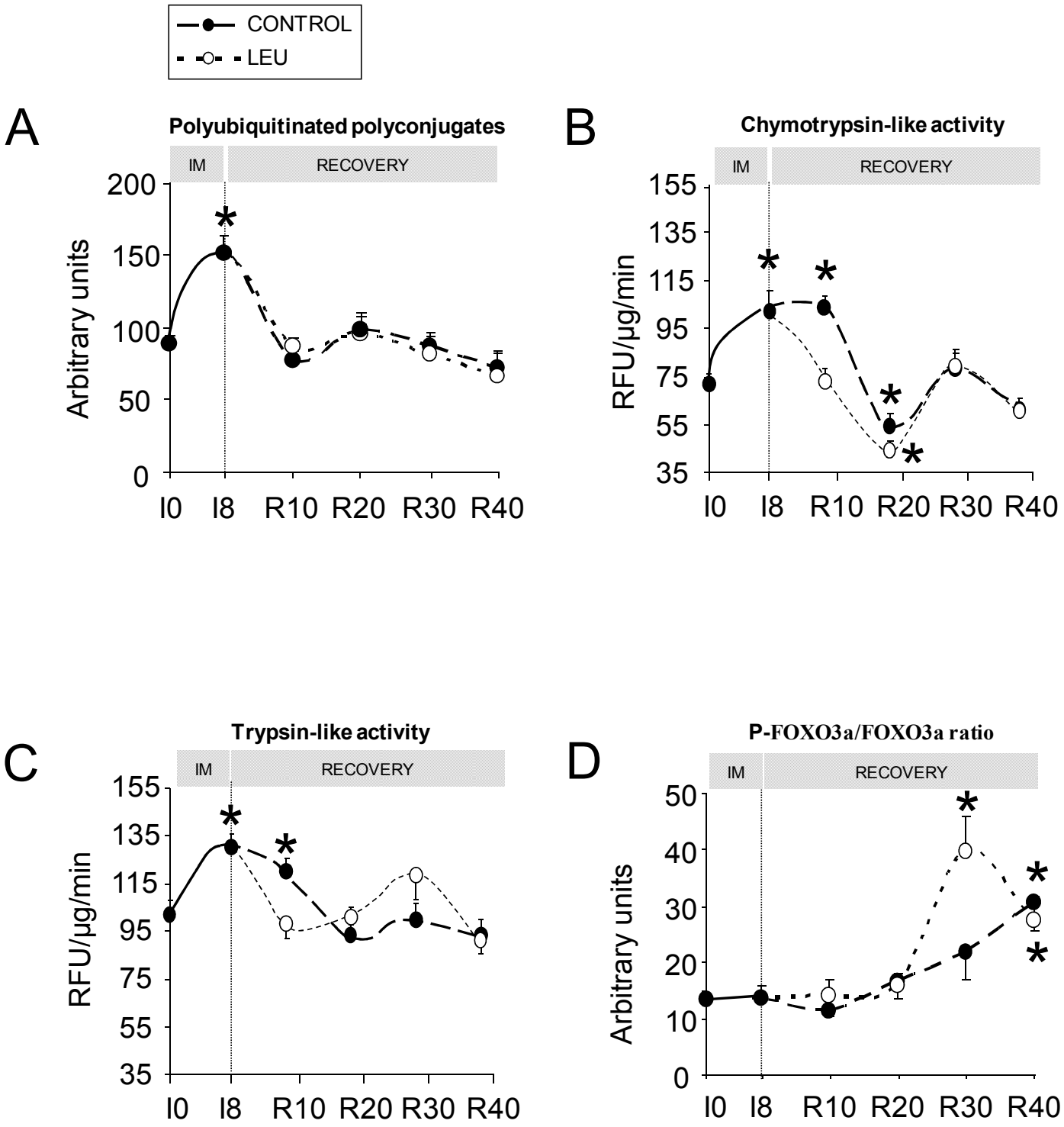
tel-00719700, version 1 - 20 Jul 2012

Figure 2: Muscle mass of gastrocnemius after immobilization and after the nutritional supplementation



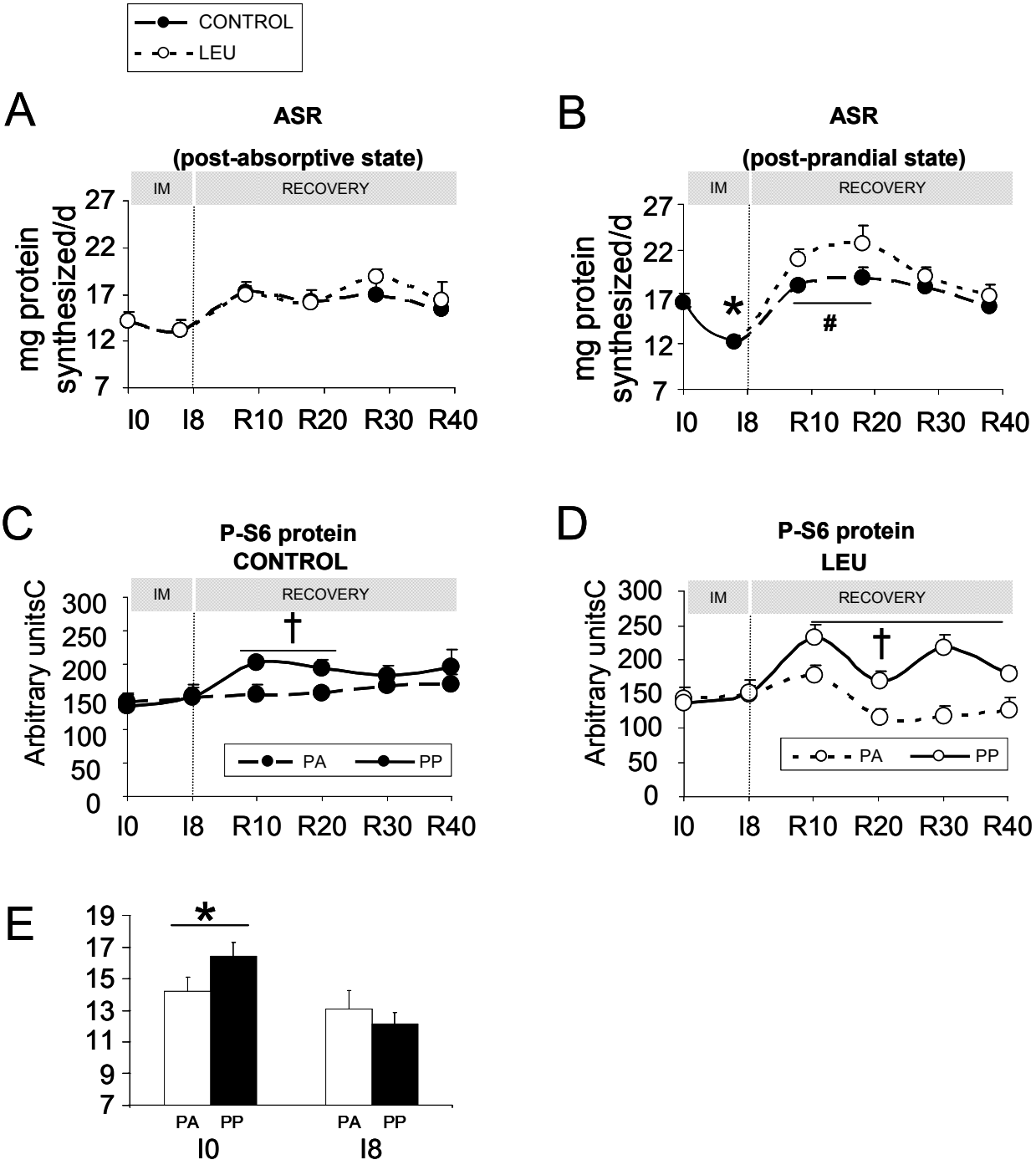
tel-00719700, version 1 - 20 Jul 2012

Figure 3: Ubiquitin-proteasome-dependant proteolysis in gastrocnemius muscles before and after the nutritional intervention



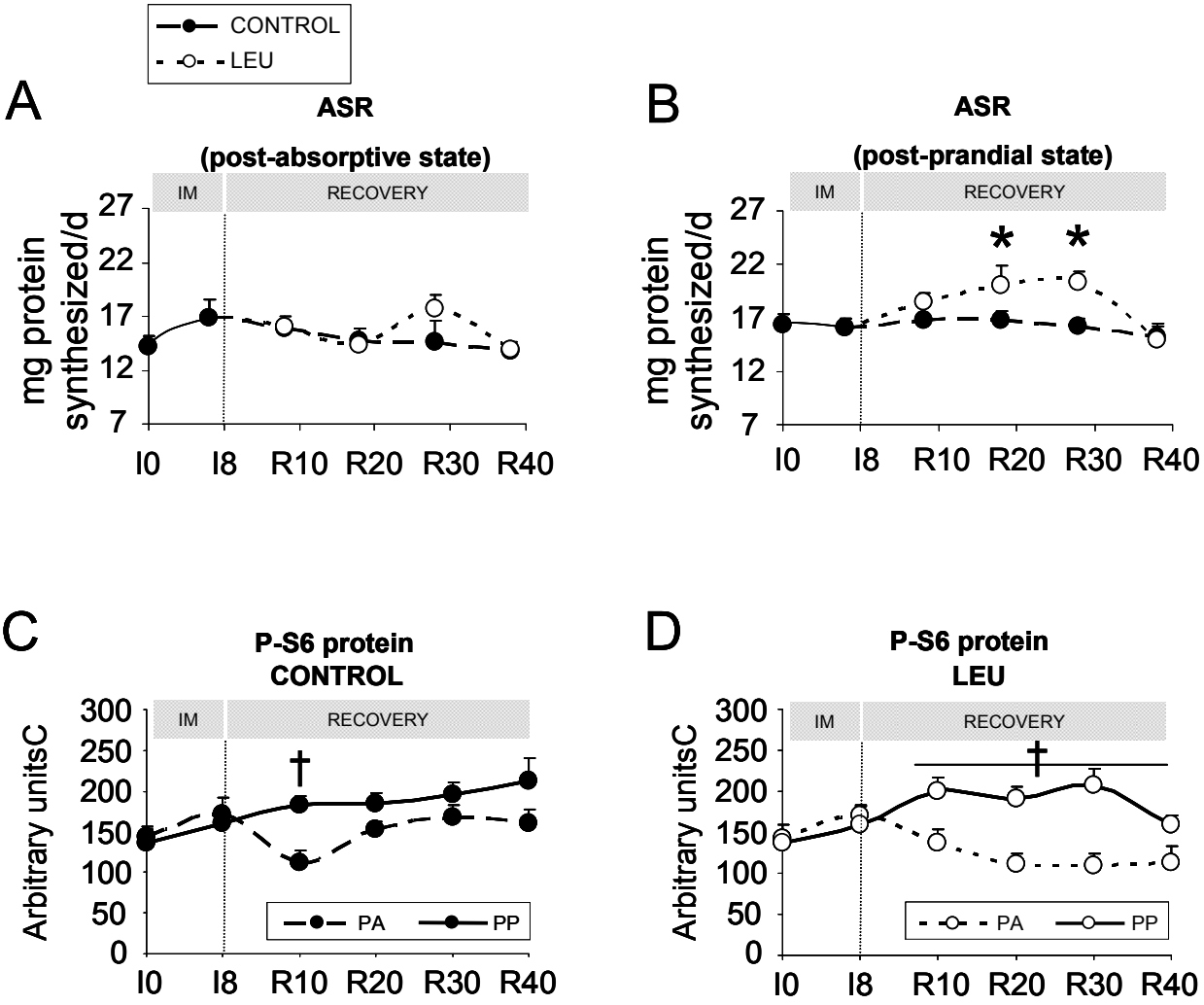
tel-00719700, version 1 - 20 Jul 2012

Figure 4: Muscle protein synthesis and protein pathway in gastrocnemius muscles before and after the nutritional intervention



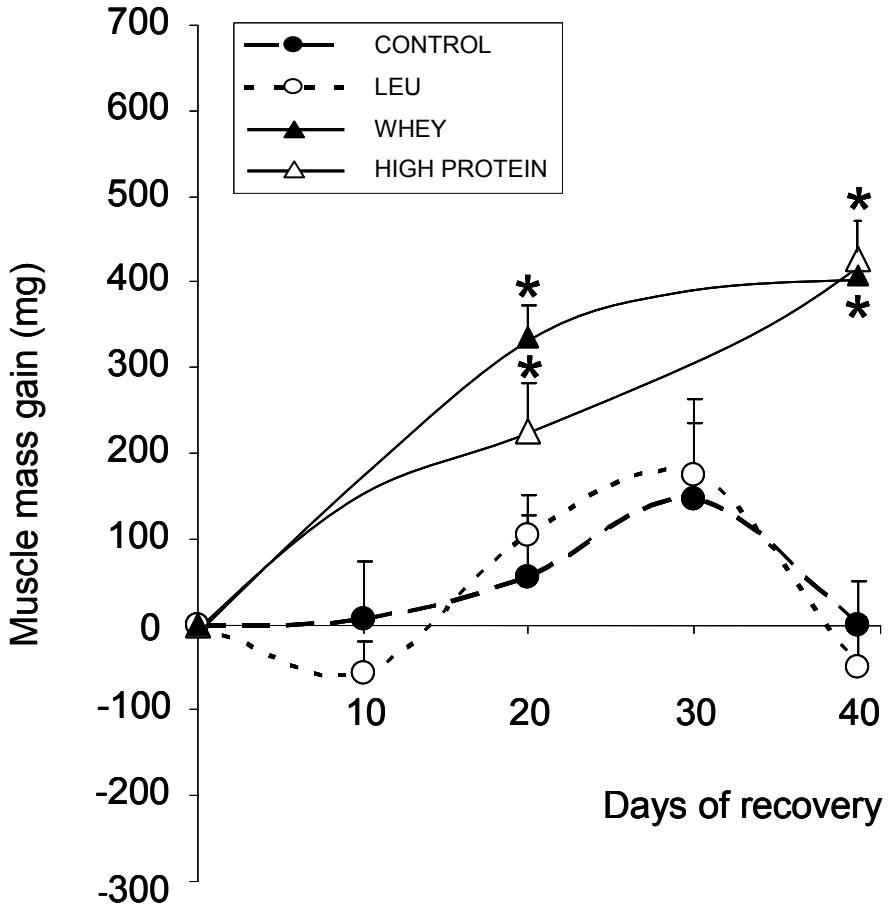
tel-00719700, version 1 - 20 Jul 2012

Figure 5: Muscle protein synthesis in gastrocnemius non-immobilized muscles



tel-00719700, version 1 - 20 Jul 2012

Figure 6: Muscle mass gain during the recovery period after the nutritional intervention



tel-00719700, version 1 - 20 Jul 2012

tel-00719700, version 1 - 20 Jul 2012

DISCUSSION GENERALE

& PERSPECTIVES

Notre travail a eu pour but d'étudier l'un des mécanismes à l'origine du développement de la sarcopénie (immobilisation générant des pertes de masses musculaires non récupérées) afin de mettre en place une stratégie nutritonnelle adaptée. L'immobilisation chez le rat âgé et l'absence de récupération de masse musculaire s'accompagnent de modifications métaboliques que nous avons caractérisées à partir de plusieurs protocoles expérimentaux.

L'ensemble des données obtenues nous a permis

- de caractériser ces modifications biochimiques à la suite d'une période d'immobilisation et après une phase de récupération musculaire. Ceci nous a permis de : 1/ démontrer que l'immobilisation pouvait aggraver la sarcopénie, comme l'un des éléments du « catabolic crisis model », et 2/ mettre en évidence une « résistance anabolique » à l'effet des acides aminés au cours de la période de récupération musculaire et ainsi d'expliquer l'absence de récupération musculaire chez le rat âgé immobilisé.

- de dégager des pistes concernant des interventions nutritionnelles. Après l'observation du phénomène de « résistance anabolique » à l'effet des acides aminés nous avons tenté de réverser ce phénomène par l'utilisation de la leucine, acide aminé bien connu pour son effet anabolique en particulier au cours du vieillissement. Cette expérimentation nous a permis de dégager un nouveau concept, celui de « désynchronisation » entre l'effet « signal » de la leucine et la biodisponibilité des autres acides aminés substrats de la synthèse protéique. Nous avons complété ces observations par une étude pilote de supplémentations nutritionnelles nous permettant, *à priori*, de valider ce concept de « désynchronisation ».

Atrophie et récupération musculaire en réponse à l'immobilisation :

La plupart des études s'intéressant à la fonte musculaire liée à l'âge (i.e. la sarcopénie) se sont intéressées à une perte de masse musculaire lente et continue (perte « physiologique », lorsque l'individu est en bonne santé). Dans ce travail nous nous sommes intéressés à des pertes beaucoup plus brutales telles qu'elles peuvent exister au cours d'épisodes cataboliques (inflammation, fractures, maladie…) au cours du vieillissement « normal ». L'alitement est une situation fréquemment observée au cours du vieillissement, mais peu d'études se sont intéressées à son rôle déterminant dans la mise en place de la sarcopénie. Nous avons montré qu'une période d'immobilisation (8 jours)

tel-00719700, version 1 - 20 Jul 2012

induisait une perte de masse musculaire non récupérée (même après 40 jours de déplâtrage) alors que l'immobilisation d'animaux adultes par le même modèle de plâtrage induisait une atrophie musculaire identique mais suivie d'une récupération de masse musculaire (Vazeille et coll. 2008). Cette absence de récupération musculaire avait déjà été mise en évidence en réponse à des stimuli cataboliques tels qu'un traitement aux glucocorticoïdes ou la privation alimentaire (Dardevet et coll. 1995 ; Mosoni et coll. 1999), mais aussi au cours de l'immobilisation chez l'animal âgé (Chakravarthy et coll. 2000 ; Pattison et coll. 2003a) ou la personne âgée (Suetta et coll. 2009). **Il semble donc que quelle que soit la situation génératrice d'atrophie musculaire, le muscle de l'animal ou de l'homme âgé soit incapable de récupérer totalement la masse musculaire perdue.** Ce phénomène fait partie intégrante du « catabolic crisis model » décrit par English & Paddon-Jones (2010), qui suggèrent que chaque épisode catabolique au cours de la vie pourrait être suivi d'une absence de récupération musculaire et aggraverait ainsi la sarcopénie. Ceci est important dans la mesure où 1/ la première fonction du muscle est la fonction de locomotion (l'individu âgé sarcopénique éprouvant donc des difficultés à se mouvoir) et, 2/ le muscle est le principal réservoir d'acides aminés mobilisables en cas d'agression pour synthétiser des protéines de réponse à l'agression (la personne âgée devenant donc plus sensible à diverses agressions commes les infections, par exemple, mais aussi résistante à l'effet des traitements).

Nous avons aussi montré que cette immobilisation pouvait induire une perte de masse musculaire généralisée, puisque nos animaux âgés perdent du muscle dans la patte controlatérale non immobilisée et ceci, 20 jours après le déplâtrage. Aucune des mesures que nous avons réalisées ne nous a permis d'expliquer ce phénomène, qui traduit l'effet généralisé que peut avoir un épisode catabolique sur la perte de masse musculaire au cours du vieillissement. Ces résultats sont cependant en accord avec une étude d'expression génique réalisée chez des sujets âgés immobilisés par plâtrage : dans cette étude, des modifications de gènes régulant le stress cellulaire, la structure des sarcomères, la croissance et la mort cellulaire et le taux de renouvellement protéique avaient été mises en évidence dans la jambe non plâtrée (Chen et coll. 2007). Il apparaît donc clairement qu'au cours du vieillissement, un simple stress localisé est capable d'influencer les métabolismes au niveau corps entier. L'apparition de cette perte de masse pourrait être reliée à l'apparition d'un stress oxydant au cours de la période de récupération, comme nous l'avons montré. Ainsi, l'immobilisation pourrait entraîner tout d'abord un stress local (dans

tel-00719700, version 1 - 20 Jul 2012

la patte immobilisée) auquel l'organisme âgé ne pourrait pas répondre de façon adaptée, comme le ferait un adulte. Ceci entraînerait la mise en place d'un second stress, plus tardif et général (dans la patte non immobilisée, 20 jours après la fin du stress initial). Ces observations peuvent être rapprochées d'études chez la personne âgée montrant qu'une personne ayant été victime d'une fracture du col du fémur avait plus de chance de décéder au cours de l'année suivant son hospitalisation qu'une personne n'ayant pas eu de problème de santé. Une fracture du col du fémur, comme l'immobilisation, pourrait entraîner un stress généralisé chez la personne âgée qui serait incapable d'y répondre favorablement. Ces phénomènes sont importants à prendre en compte en clinique, lorsqu'une personne âgée se retrouve alitée, et tous les moyens possibles (rééducation active ou passive, supports nutritionnels) doivent être mis en œuvre pour limiter la perte de masse et de force musculaire.

Mécanismes impliqués dans l'atrophie musculaires chez le rat âgé immobilisé :

Nous avons montré que l'atrophie induite par l'immobilisation est due à une **activation concomitante des voies de dégradation (système ubiquitine-protéasome-dépendant) et d'apoptose cellulaire (apoptose mitochondriale dépendante des caspases), ainsi qu'à une répression de la synthèse protéique musculaire et des processus de régénération/différenciation musculaire. Ces mêmes mécanismes sont activés ou réprimés de la même façon chez le rat adulte immobilisé par plâtrage, conduisant à une atrophie musculaire identique ; cependant ils sont activés dans des proportions différentes.** Ainsi, l'activation du système ubiquitine-protéasome-dépendant avait précédemment été démontrée chez des animaux adultes immobilisés (Taillandier et coll. 1996 ; Bodine et coll. 2001 ; Berthon et coll. 2007 ; Krawiec et coll. 2005 ; Vazeille et coll. 2008), mais il s'agit de la première étude à avoir démontré cette augmentation chez des animaux âgés immobilisés par plâtrage. Ce système semble cependant moins activé au cours du vieillissement (+53% pour l'activité chymotrypsin-like du proteasome chez des âgés contre +138% chez des adultes) (Vazeille et coll. 2008). Les autres systèmes protéolytiques semblent activés au cours du vieillissement et de l'inactivité physique. Il est donc indispensable de mesurer l'impact de ces différents processus, en particulier la voie de l'autophagie qui semble activée de façon concomitante à la voie ubiquitine-protéasome-dépendante (notamment via le facteur de transcription FoxO). A l'inverse, les processus apoptotiques semblent plus activés chez des animaux âgés (index apoptotique augmenté de

tel-00719700, version 1 - 20 Jul 2012

500% chez des animaux âgés contre 200% chez des animaux adultes) (Vazeille et coll. 2008). Les mécanismes impliqués dans cette différence de réponse de ces deux voies au cours du vieillissement restent inconnus. Les processus de régénération/différenciation musculaire et de synthèse protéique musculaire semblent activés de la même façon par l'immobilisation entre les deux âges. Ainsi, la diminution de la régénération/différenciation musculaire (Vazeille et coll. 2008) et la diminution de la synthèse protéique à l'état postprandial (Ferrando et coll. 1996 ; Paddon-Jones et coll. 2006 ; de Boer et coll. 2007 ; Glover et coll. 2008) avaient déjà été observées chez des adultes immobilisés. Ces processus semblent donc être les moins dérégulables au cours du vieillissement, leur réponse étant identique à celle d'un animal adulte immobilisé. Comment des processus régulés dans des proportions différentes peuvent-ils aboutir à une atrophie identique ? D'autres processus impliquant des voies de signalisation autres que les taux de renouvellement protéique et cellulaire permettent certainement d'expliquer ce phénomène. Très probablement, des modifications de la teneur en eau du muscle, ou des remodelages matriciels interviennent dans la régulation de la masse musculaire, et ceux-ci seraient différemment régulés en fonction de l'âge. Ainsi, des modifications du tissu conjonctif ont été mises en évidence après des périodes d'immobilisation chez le rat adulte (Jarvinen et coll. 2002). La diminution de l'aire des fibres musculaires s'accompagne alors d'une augmentation de la matrice extra-cellulaire et du contenu en collagène mais sans modification de la masse chez le rat adulte (Willems et coll. 2010).

Mécanismes impliqués dans le défaut de récupération musculaire chez le rat âgé immobilisé – Concept de « résistance anabolique » :

S'il est important de comprendre les mécanismes mis en jeu au cours de l'immobilisation afin de trouver de nouvelles voies à cibler pour limiter la perte musculaire, il est tout aussi important de comprendre ces différents mécanismes au cours de la phase de récupération afin de potentialiser le gain de masse musculaire. A notre connaissance, cette étude est la première à s'intéresser aux mécanismes mis en jeu au cours de la phase de récupération pour expliquer cette absence de récupération musculaire liée à l'âge. Ainsi, plusieurs études avaient précédemment observé une absence de récupération musculaire chez l'animal âgé (Chakravarthy et coll. 2000) ou la personne âgée (Suetta et coll. 2009), mais sans en démontrer les mécanismes. **La seule normalisation du système ubiquitine-protéasome-dépendant, de l'apoptose, des processus de**

tel-00719700, version 1 - 20 Jul 2012

tel-00719700, version 1 - 20 Jul 2012

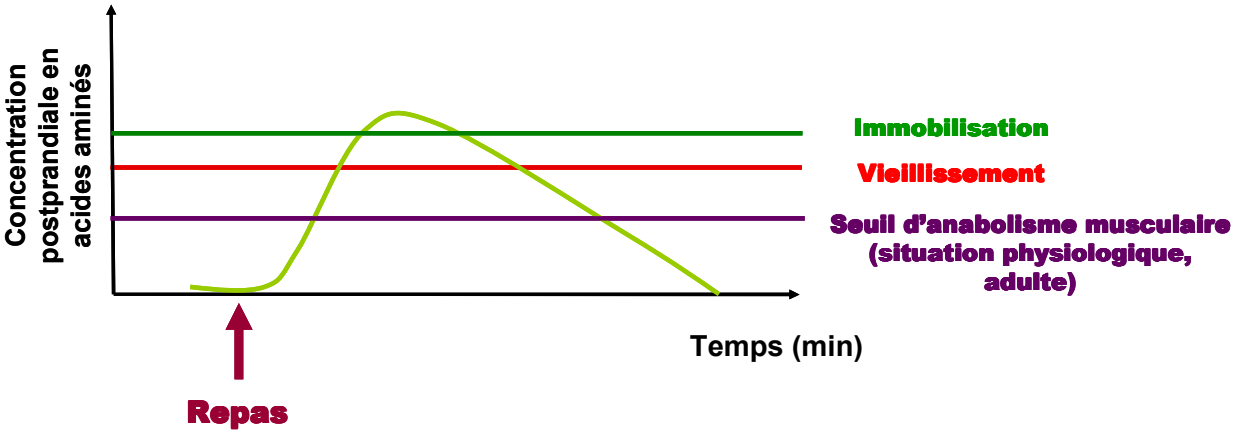


Figure 41 : Concept de « résistance anabolique au cours de l'immobilisation.

régénération/différenciation et de la synthèse protéique musculaire que nous avons enregistrée nous permet d'expliquer le défaut de récupération. En effet, le gain de masse musculaire nécessite un gain de protéines et ceci passe par un arrêt de la protéolyse musculaire ou mieux, une diminution de celle-ci en dessous des valeurs basales ; une augmentation de la synthèse protéique au-dessus de ses valeurs basales, ou toutes les combinaisons de ces processus afin d'établir une balance azotée positive. Or, dans notre étude, protéolyse et protéosynthèse ne sont respectivement que normalisée et très faiblement augmentée, ne permettant pas une synthèse efficace de protéines. Il en résulte donc une balance azotée peu ou pas positive. Ceci a pour principal effet d'arrêter la perte de masse musculaire, voire de gagner une faible quantité de protéines.

Pourquoi n'y a-t-il pas de balance azotée suffisamment positive, et donc un gain efficace de protéines ? Les muscles âgés immobilisés semblent résistants à l'effet stimulateur des acides aminés sur la synthèse protéique musculaire au cours de la période de récupération musculaire. Autrement dit, les acides aminés ne parviennent pas à induire un anabolisme protéique suffisamment important ou suffisamment long dans le temps pour induire un réel gain de protéines musculaires. Ce phénomène, décrit sous le nom de « résistance anabolique » (Glover et coll. 2008 ; Philipps et coll. 2009 ; Rennie et coll. 2010), a été précédemment mis en évidence chez des adultes immobilisés (Ferrando et coll. 1996 ; Paddon-Jones et coll. 2006 ; de Boer et coll. 2007 ; Glover et coll. 2008). Chez ces adultes, l'immobilisation entraîne une moindre stimulation de la synthèse protéique musculaire postprandiale en réponse à la prise d'acides aminés. Ceci suggère que chez l'adulte immobilisé, des quantités d'acides aminés plus importantes doivent être utilisées pour contrecarrer la perte de masse musculaire. **Il s'agit de la première étude démontrant cette « résistance anabolique » au cours du vieillissement et en cas d'immobilisation (Figure 41).** Au cours du vieillissement, l'effet du repas global, et des acides aminés en particulier (notamment la leucine), est altéré. Afin d'obtenir une synthèse protéique musculaire identique à celle de l'adulte, il est nécessaire d'utiliser des quantités d'acides aminés (notamment la leucine) plus importantes chez l'animal ou l'homme âgé. Chez le rat âgé immobilisé, cette réduction de l'effet global des acides aminés sur le métabolisme protéique musculaire semble majorée, rendant l'établissement d'une balance azotée suffisante pour un gain de protéines impossible. L'utilisation de quantités d'acides aminés plus importantes, via nos régimes hyperprotéinés, confirme l'existence de cette « résistance anabolique ». Cette altération de l'effet des acides aminés pourrait être due à la

tel-00719700, version 1 - 20 Jul 2012

tel-00719700, version 1 - 20 Jul 2012

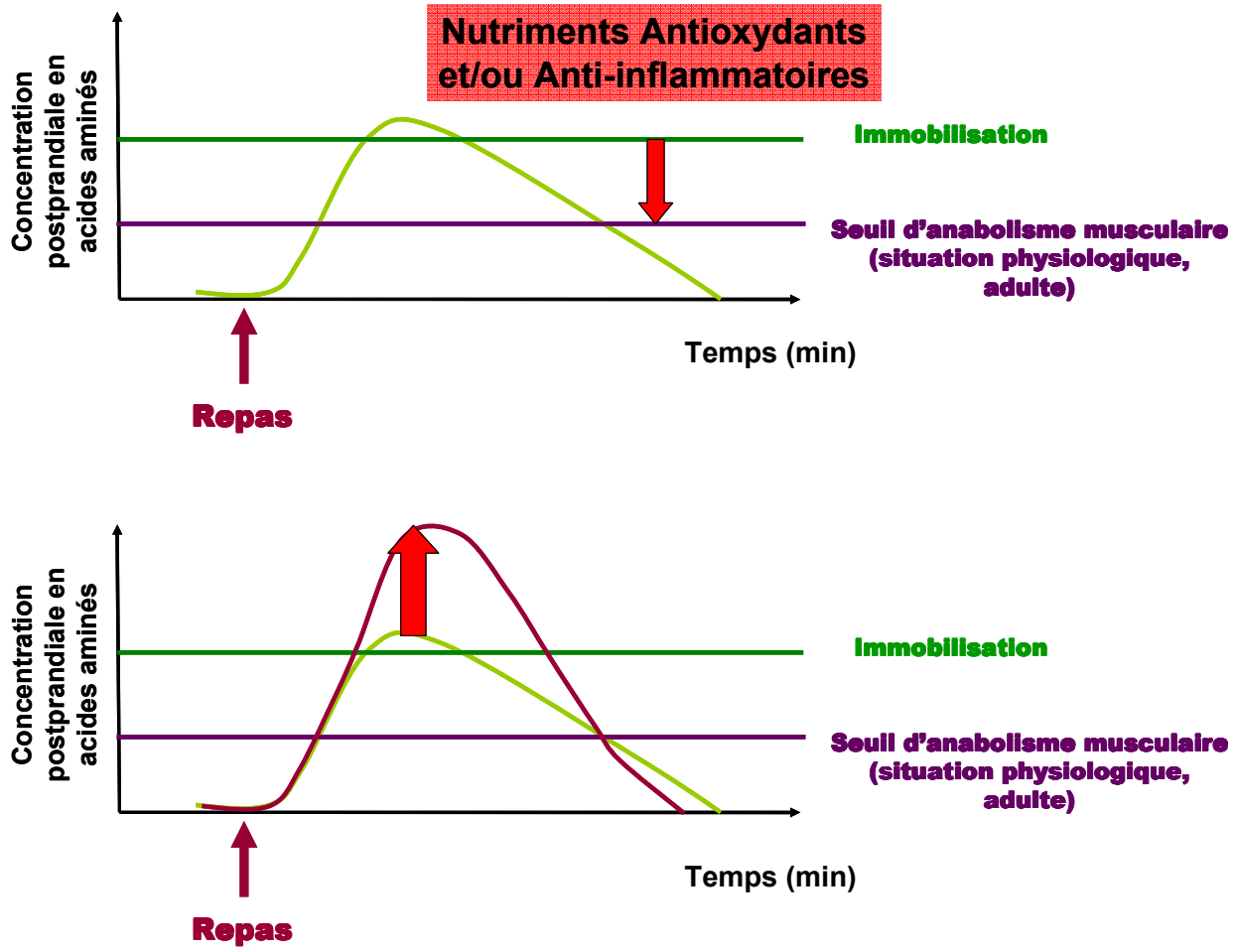


Figure 42 : Stratégies nutritionnelles permettant de diminuer le seuil d'anabolisme musculaire augmenté par l'immobilisation ou de dépasser ce seuil.

présence d'une importante inflammation générée par l'immobilisation (Kondo et coll. 1991 ; Zarzhevsky et coll. 2001b ; Lawler et coll. 2003 ; Biolo et coll. 2008) et d'un fort stress oxydant qui apparaît au cours de la période de récupération dans notre étude. Or, l'inflammation et le stress oxydant sont connus pour altérer la synthèse protéique musculaire (Marzani et coll. 2008 ; Rieu et coll. 2009).

De nouvelles stratégies nutritionnelles peuvent alors être envisagées selon 2 grands axes afin de lutter contre cette « résistance anabolique » :

1/ tenter de réverser cette « résistance anabolique » : pour cela, il convient de diminuer le seuil d'anabolisme postprandial, déjà élevé au cours du vieillissement et ceci semble majoré au cours de l'immobilisation. Toutes les stratégies permettant de lutter contre cette élévation d'u seuil d'anabolisme musculaire doivent être envisagées. L'une d'entre elles pourrait être, par exemple, de lutter contre l'inflammation et le stress oxydant présents au cours du vieillissement et de l'immobilisation par des supplémentations nutritionnelles contenant des molécules possédant des propriétés antioxydantes et/ou anti-inflammatoires (**Figure 42**). Ces stratégies nutritionnelles doivent cependant être maniées avec précautions dans la mesure où l'inflammation, notamment, est nécesssaire à la mise en place d'une récuparation musculaire efficace (You et coll. 2010).

2/ tenter de dépasser le seuil d'anabolisme musculaire élevé et ainsi de déclencher la synthèse protéique musculaire postprandiale. Ceci peut être obtenu en jouant sur le métabolisme protéique par l'utilisation d'un acide aminé « signal », la leucine. Cette stratégie a été employée au cours de notre travail et sera détaillée ci-dessous (**Figure 42**).

3/ enfin, toute stratégie nutritionnelle combinant les deux précédents points doit être envisagée. Ainsi, une combinaison d'une nutrition protéique (leucine) et de composés anti-inflammatoires et/ou antioxydants pourrait permettre de maximiser le gain protéique en diminuant les phénomènes d'apoptose notamment (sensibles à une forte inflammation), et en stimulant l'accrétion protéique (en abaissant le seuil d'anabolisme protéique musculaire et en déclanchant cet anabolisme via le « signal » leucine).

Effet de la leucine sur la récupération musculaire et concept de « désynchronisation » :

Nous avons cherché à potentialiser le gain de masse musculaire par des supplémentations nutritionnelles. Le gain de masse musculaire nécessitant une accrétion

tel-00719700, version 1 - 20 Jul 2012

protéique, nous nous sommes focalisés sur une nutrition protéique, bien connue pour agir sur le métabolisme protéique. Le but était de stimuler l'anabolisme musculaire postprandial afin de positiver la balance azotée. Nous avons réalisé des supplémentations en leucine (4,45%), un acide aminé « signal » c'est-à-dire ayant un effet stimulateur sur la synthèse protéique musculaire et un effet inhibiteur sur la protéolyse musculaire (Buse & Reid 1975 ; Frexes-Steed et coll. 1992 ; Crozier et coll. 2005). Cet effet a notamment été observé au cours du vieillissement (Dardevet et coll. 2002 ; Katsanos et coll. 2006 ; Combaret et coll. 2005 ; Rieu et coll. 2003-2006-2007), la leucine permettant au cours de cette situation physiologique de restaurer le défaut d'anabolisme postprandial lié à l'âge (Dardevet et coll. 2003 ; Rieu et coll, 2006). La majorité des études se sont attachées à démontrer l'impact d'une nutrition protéique au cours de la période d'immobilisation dans la limitation de l'atrophie musculaire (Paddon-Jones et coll. 2006 ; Baptista et coll. 2010 ; Ferrando et coll. 2010), mais peu d'études se sont intéressées à la phase de récupération musculaire, encore moins au cours du vieillissement. **Il s'agit de la première étude démontrant les propriétés de la leucine sur la récupération musculaire post-immobilisation au cours du vieillissement. Notre supplémentation en leucine libre a permis de stimuler le métabolisme protéique dans des proportions non négligeables, en inhibant la dégradation ubiquitine-protéasome-dépendante et en stimulant la protéosynthèse musculaire.** L'effet de la leucine sur la synthèse protéique musculaire a pu être mis en évidence par une stimulation de la voie de signalisation de la synthèse protéique, avec une augmentation de la quantité de protéine S6 phosphorylée. **Cependant, cet effet de la leucine sur le métabolisme protéique ne s'est pas traduit par un gain de masse musculaire. La leucine libre n'a permis d'obtenir qu'une balance azotée faiblement positive.** Il est important de noter que, jusqu'à présent, la majorité des études ayant cherché à potentialiser une récupération de masse musculaire chez des animaux ou des personnes âgés à l'aide de leucine libre ont échoué. Une seule étude à ce jour, a montré un effet positif de la leucine sur le gain de masse musculaire chez la personne âgée, et ces supplémentations ont été réalisées pendant 6 mois (Verhoeven et coll. 2009).

La leucine étant sous une forme libre, elle est absorbée rapidemment. Les protéines de caséines (la matrice dans laquelle la leucine est incorporée), sont des protéines à digestion lente ; c'est-à-dire que les acides aminés constitutifs sont digérés lentement et ne vont générer qu'une faible augmentation de l'aminoacidémie postprandiale. Pour expliquer l'absence de gain de masse musculaire, nous postulons que la leucine, de par son

tel-00719700, version 1 - 20 Jul 2012

absorption rapide, générerait son signal bien avant que les autres acides aminés (issus de la digestion lente des protéines de caséines) soient absorbés. **Ainsi, le signal leucine parviendrait au muscle avant l'arrivée des autres acides aminés substrats de la synthèse protéique et il y aurait donc une « désynchronisation » entre le signal stimulateur du métabolisme protéique et l'arrivée des acides aminés substrats de la synthèse protéique.**

Effet de régimes riches en lactosérum ou de régimes hyper protéinés sur la récupération musculaire – Comment réverser la « désynchronisation » ?

Si notre hypothèse d'une « désynchronisation » est correcte, il convient de resynchroniser le signal leucine et l'arrivée des acides aminés substrats afin de déclencher une accrétion protéique durable et intense. Pour cela, il faut obtenir une aminoacidémie suffisament rapide (pour être obtenue en même temps que le signal leucine) et importante (pour dépasser le seuil d'anabolisme protéique élevé au cours du vieillissement et de l'immobilisation). Dans ce but, 2 types de stratégies nutritionnelles peuvent être envisagées :

1/ Tout d'abord, nous avons réalisé des supplémentations avec des régimes riches en lactosérum (13%). Le lactosérum étant une protéine riche en leucine et à digestion rapide, elle permet d'obtenir rapidement une hyperaminoacidémie nécessaire à la stimulation de la synthèse protéique, couplée à un signal leucine lui aussi rapide. Le lactosérum a ainsi montré des propriétés de stimulation de la synthèse protéique meilleures que les caséines chez la personne âgée (Pennings et coll. 2011).

2/ Ensuite, nous avons essayé de coupler l'effet du lactosérum à un effet de masse, en réalisant des régimes hyperprotéinés à 26% de protéines (50% de lactosérum + 50% de caséines). Ces régimes contiennent à la fois une forte proportion d'acides aminés permettant d'induire massivement et rapidement une hyperaminoacidémie et la leucine nécessaire pour déclencher l'anabolisme protéique. Chez le rat adulte, des régimes hyperprotéinés contenant 53% de protéines permettent une apparition plus rapide des acides aminés au niveau périphérique dès 1h comparé à des régimes normoprotéiques (Fromentin et coll. 2011) mais l'effet chez le rat âgé immobilisé est inconnu.

Ces deux régimes ont permis d'induire une récupération musculaire non négligeable (42 à 58% de récupération de la masse musculaire perdue). Ces régimes

tel-00719700, version 1 - 20 Jul 2012

ont permis, *à priori*, d'augmenter massivement la quantité d'acides aminés substrats au sein du muscle. Notre hypothèse de désynchronisation semble donc être confirmée, mais seuls des aminogrammes mesurant une augmentation des teneurs en acides aminés nous permettront de confirmer ceci.

De plus, avec ces supplémentations, il n'y avait pas de perte de masse dans la patte controlatérale non plâtrée. Ces deux régimes ont donc permis de stimuler le métabolisme protéique musculaire de façon généralisée afin d'éviter la perte de masse musculaire dans la patte controlatérale.

Cependant, il convient d'analyser les voies de protéolyse et de synthèse protéique avant de conclure à une amélioration du métabolisme protéique musculaire.

En conclusion, l'ensemble de nos données suggère que l'immobilisation serait responsable d'une forte altération du métabolisme protéique postprandial au niveau musculaire. Il en résulterait une forte « résistance anabolique » du muscle à l'effet stimulateur des acides aminés, ceci se traduisant par une incapacité du muscle squelettique immobilisé à récupérer la masse perdue au cours de l'immobilisation. Nos travaux ont de plus permis de mettre en évidence un nouveau concept, celui de « désynchronisation » entre l'effet stimulateur de la leucine libre et la biodisponibilité des acides aminés substrats de la synthèse protéique. Ce concept, s'il se vérifie, pourrait être la clé de l'absence de récupération musculaire chez le rat âgé immobilisé, mais aussi dans d'autres situations génératrices d'atrophie musculaire au cours du vieillissement.

La sarcopénie consiste en une perte de masse et de fonctionnalité musculaires. Il est important, chez la personne âgée que l'augmentation de masse (traduisant la quantité de protéines mises « en réserve » et donc la capacité à réagir au cours de situations d'agression) s'accompagne d'une amélioration de la fonctionnalité (traduisant l'autonomie fonctionnelle de la personne âgée). Si notre supplémentation en leucine ne s'est pas traduite en termes de gain de masse musculaire, il est fort possible qu'elle se soit néanmoins traduite en une amélioration de la fonctionnalité musculaire. En effet, la stimulation du taux de renouvellement protéique musculaire pourrait concerner notamment les différents types de fibres musculaires, les acides aminés étant connus pour leur rôle stimulateur à ce niveau, en particulier au cours du vieillissement (Pansarasa et coll. 2008). Ainsi, des supplémentations en acides aminés permettent de contrecarrer les effets du vieillissement sur le muscle en augmentant la taille et la densité des fibres musculaires. Enfin, il est indispensable de vérifier si nos régimes ayant permis un gain de masse

tel-00719700, version 1 - 20 Jul 2012

musculaire se sont aussi traduits en une amélioration de la fonctionnalité musculaire. L'ensemble de nos observations doivent encore être validées chez l'homme au cours d'études d'immobilisation chez la personne âgée.

tel-00719700, version 1 - 20 Jul 2012

tel-00719700, version 1 - 20 Jul 2012

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Abadi A, Glover EI, Isfort RJ, Raha S, Safdar A, Yasuda N, Kaczor JJ, Melov S, Hubbard A, Qu X, Phillips SM & Tarnopolsky M. (2009). Limb immobilization induces a coordinate down-regulation of mitochondrial and other metabolic pathways in men and women. *PloS one* 4, e6518.

Adams GR, Caiozzo VJ & Baldwin KM. (2003). Skeletal muscle unweighting: spaceflight and ground-based models. *J Appl Physiol* 95, 2185-2201.

Adhihetty PJ, O'Leary MF, Chabi B, Wicks KL & Hood DA. (2007). Effect of denervation on mitochondrially mediated apoptosis in skeletal muscle. *J Appl Physiol* 102, 1143-1151.

Agostini F, Dalla Libera L, Rittweger J, Mazzucco S, Jurdana M, Mekjavic IB, Pisot R, Gorza L, Narici M & Biolo G. (2010). Effects of inactivity on human muscle glutathione synthesis by a double-tracer and single-biopsy approach. *The Journal of physiology* 588, 5089-5104.

Alikhani M, Alikhani Z, Raptis M & Graves DT. (2004). TNF-alpha in vivo stimulates apoptosis in fibroblasts through caspase-8 activation and modulates the expression of pro-apoptotic genes. *Journal of cellular physiology* 201, 341-348.

Allen DL, Monke SR, Talmadge RJ, Roy RR & Edgerton VR. (1995). Plasticity of myonuclear number in hypertrophied and atrophied mammalian skeletal muscle fibers. *J Appl Physiol* 78, 1969-1976.

Allen DL, Yasui W, Tanaka T, Ohira Y, Nagaoka S, Sekiguchi C, Hinds WE, Roy RR & Edgerton VR. (1996). Myonuclear number and myosin heavy chain expression in rat soleus single muscle fibers after spaceflight. *J Appl Physiol* 81, 145-151.

Allen DL, Linderman JK, Roy RR, Grindeland RE, Mukku V & Edgerton VR. (1997a). Growth hormone/IGF-I and/or resistive exercise maintains myonuclear number in hindlimb unweighted muscles. *J Appl Physiol* 83, 1857-1861.

Allen DL, Linderman JK, Roy RR, Bigbee AJ, Grindeland RE, Mukku V & Edgerton VR. (1997b). Apoptosis: a mechanism contributing to remodeling of skeletal muscle in response to hindlimb unweighting. *The American journal of physiology* 273, C579-587.

Allen DL, Roy RR & Edgerton VR. (1999). Myonuclear domains in muscle adaptation and disease. *Muscle & nerve* 22, 1350-1360.

Allen DL, Sartorius CA, Sycuro LK & Leinwand LA. (2001). Different pathways regulate expression of the skeletal myosin heavy chain genes. *The Journal of biological chemistry* 276, 43524-43533.

Altun M, Besche HC, Overkleeft HS, Piccirillo R, Edelmann MJ, Kessler BM, Goldberg AL & Ulfhake B. (2010). Muscle wasting in aged, sarcopenic rats is associated with enhanced activity of the ubiquitin proteasome pathway. *The Journal of biological chemistry* 285, 39597-39608.

Alvestrand A, Hagenfeldt L, Merli M, Oureshi A & Eriksson LS. (1990). Influence of leucine infusion on intracellular amino acids in humans. *European journal of clinical investigation* 20, 293-298.

Alway SE, Degens H, Krishnamurthy G & Chaudhrai A. (2003). Denervation stimulates apoptosis but not Id2 expression in hindlimb muscles of aged rats. *The journals of gerontology* 58, 687-697.

Andrianjafiniony T, Dupre-Aucouturier S, Letexier D, Couchoux H & Desplanches D. (2010). Oxidative stress, apoptosis, and proteolysis in skeletal muscle repair after unloading. *American journal of physiology* 299, C307-315.

Aniansson A, Grimby G & Hedberg M. (1992). Compensatory muscle fiber hypertrophy in elderly men. *J Appl Physiol* 73, 812-816.

tel-00719700, version 1 - 20 Jul 2012

Anthony JC, Anthony TG & Layman DK. (1999). Leucine supplementation enhances skeletal muscle recovery in rats following exercise. *The Journal of nutrition* 129, 1102-1106.

Anthony JC, Yoshizawa F, Anthony TG, Vary TC, Jefferson LS & Kimball SR. (2000a). Leucine stimulates translation initiation in skeletal muscle of postabsorptive rats via a rapamycin-sensitive pathway. *The Journal of nutrition* 130, 2413-2419.

Anthony JC, Anthony TG, Kimball SR, Vary TC & Jefferson LS. (2000b). Orally administered leucine stimulates protein synthesis in skeletal muscle of postabsorptive rats in association with increased eIF4F formation. *The Journal of nutrition* 130, 139-145.

Anthony TG, Anthony JC, Yoshizawa F, Kimball SR & Jefferson LS. (2001). Oral administration of leucine stimulates ribosomal protein mRNA translation but not global rates of protein synthesis in the liver of rats. *The Journal of nutrition* 131, 1171-1176.

Antonione R, Caliandro E, Zorat F, Guarnieri G, Heer M & Biolo G. (2008). Whey protein ingestion enhances postprandial anabolism during short-term bed rest in young men. *The Journal of nutrition* 138, 2212-2216.

Aravamudan B, Mantilla CB, Zhan WZ & Sieck GC. (2006). Denervation effects on myonuclear domain size of rat diaphragm fibers. *J Appl Physiol* 100, 1617-1622.

Arbogast S, Smith J, Matuszczak Y, Hardin BJ, Moylan JS, Smith JD, Ware J, Kennedy AR & Reid MB. (2007). Bowman-Birk inhibitor concentrate prevents atrophy, weakness, and oxidative stress in soleus muscle of hindlimb-unloaded mice. *J Appl Physiol* 102, 956-964.

Arnal MA, Mosoni L, Boirie Y, Houlier ML, Morin L, Verdier E, Ritz P, Antoine JM, Prugnaud J, Beaufrere B & Mirand PP. (1999). Protein pulse feeding improves protein retention in elderly women. *The American journal of clinical nutrition* 69**,** 1202-1208.

Arnal MA, Mosoni L, Dardevet D, Ribeyre MC, Bayle G, Prugnaud J & Patureau Mirand P. (2002). Pulse protein feeding pattern restores stimulation of muscle protein synthesis during the feeding period in old rats. *The Journal of nutrition* 132, 1002-1008.

Ashkenazi A & Dixit VM. (1998). Death receptors: signaling and modulation. *Science (New York, NY* 281, 1305-1308.

Attaix D, Aurousseau E, Combaret L, Kee A, Larbaud D, Ralliere C, Souweine B, Taillandier D & Tilignac T. (1998). Ubiquitin-proteasome-dependent proteolysis in skeletal muscle. *Reproduction, nutrition, development* 38, 153-165.

Attaix D, Combaret L, Taillandier D & Bechet D. (2002). Regulation of ubiquitin-proteasome dependent muscular proteolysis by hormones and nutrients. *Journees annuelles de diabetologie de l'Hotel-Dieu*, 123-133.

Attaix D, Ventadour S, Codran A, Bechet D, Taillandier D & Combaret L. (2005). The ubiquitin-proteasome system and skeletal muscle wasting. *Essays in biochemistry* 41, 173-186.

Attaix D. (2006). Traité de nutrition artificielle de l'adulte. *Springer*.

Attaix D & Bechet D. (2007). FoxO3 controls dangerous proteolytic liaisons. *Cell metabolism* 6, 425-427.

Attaix D & Baracos VE. (2010). MAFbx/Atrogin-1 expression is a poor index of muscle proteolysis. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care* 13, 223-224.

Avruch J, Hara K, Lin Y, Liu M, Long X, Ortiz-Vega S & Yonezawa K. (2006). Insulin and amino-acid regulation of mTOR signaling and kinase activity through the Rheb GTPase. *Oncogene* 25, 6361-6372.

Baker JH & Margolis RN. (1987). Calcium-activated protease activity in tenotomized muscle. *Muscle & nerve* 10, 34-40.

tel-00719700, version 1 - 20 Jul 2012

Baker DJ & Hepple RT. (2006). Elevated caspase and AIF gene expression correlate with progression of sarcopenia during aging in male F344BN rats. *Experimental gerontology* 41, 1149-1156.

Balage M, Averous J, Remond D, Bos C, Pujos-Guillot E, Papet I, Mosoni L, Combaret L & Dardevet D. (2009). Presence of low-grade inflammation impaired postprandial stimulation of muscle protein synthesis in old rats. *The Journal of nutritional biochemistry* 21, 325-331.

Balage M & Dardevet D. (2010). Long-term effects of leucine supplementation on body composition. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care* 13, 265-270.

Balagopal P, Rooyackers OE, Adey DB, Ades PA & Nair KS. (1997). Effects of aging on in vivo synthesis of skeletal muscle myosin heavy-chain and sarcoplasmic protein in humans. *The American journal of physiology* 273, E790-800.

Balagopal P, Schimke JC, Ades P, Adey D & Nair KS. (2001). Age effect on transcript levels and synthesis rate of muscle MHC and response to resistance exercise. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 280, E203-208.

Baptista IL, Leal ML, Artioli GG, Aoki MS, Fiamoncini J, Turri AO, Curi R, Miyabara EH & Moriscot AS. (2010). Leucine attenuates skeletal muscle wasting via inhibition of ubiquitin ligases. *Muscle & nerve* 41, 800-808.

Baracos V, Greenberg RE & Goldberg AL. (1986). Influence of calcium and other divalent cations on protein turnover in rat skeletal muscle. *The American journal of physiology* 250, E702-710.

Barani AE, Durieux AC, Sabido O & Freyssenet D. (2003). Age-related changes in the mitotic and metabolic characteristics of muscle-derived cells. *J Appl Physiol* 95, 2089-2098.

Bar-Shai M, Carmeli E, Coleman R, Rozen N, Perek S, Fuchs D & Reznick AZ. (2005). The effect of hindlimb immobilization on acid phosphatase, metalloproteinases and nuclear factor-kappaB in muscles of young and old rats. *Mechanisms of ageing and development* 126, 289-297.

Baumgartner RN, Koehler KM, Gallagher D, Romero L, Heymsfield SB, Ross RR, Garry PJ & Lindeman RD. (1998). Epidemiology of sarcopenia among the elderly in New Mexico. *American journal of epidemiology* 147, 755-763.

Beauchamp JR, Heslop L, Yu DS, Tajbakhsh S, Kelly RG, Wernig A, Buckingham ME, Partridge TA & Zammit PS. (2000). Expression of CD34 and Myf5 defines the majority of quiescent adult skeletal muscle satellite cells. *The Journal of cell biology* 151, 1221-1234.

Béchet D, Tassa A, Taillandier D, Combaret L & Attaix D. (2005). Lysosomal proteolysis in skeletal muscle. *The international journal of biochemistry & cell biology* 37, 2098-2114.

Belkhou R, Bechet D, Cherel Y, Galluser M, Ferrara M & le Maho Y. (1994). Effect of fasting and thyroidectomy on cysteine proteinase activities in liver and muscle. *Biochimica et biophysica acta* 1199, 195-201.

Berg HE, Larsson L & Tesch PA. (1997). Lower limb skeletal muscle function after 6 wk of bed rHortobagyi 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. *The Journal of physiology* 524 Pt 1, 293-304.

Berthon P, Duguez S, Favier FB, Amirouche A, Feasson L, Vico L, Denis C & Freyssenet D. (2007). Regulation of ubiquitin-proteasome system, caspase enzyme activities, and extracellular proteinases in rat soleus muscle in response to unloading. *Pflugers Arch* 454, 625-633.

tel-00719700, version 1 - 20 Jul 2012

Biolo G, Tipton KD, Klein S & Wolfe RR. (1997). An abundant supply of amino acids enhances the metabolic effect of exercise on muscle protein. *The American journal of physiology* 273, E122-129.

Biolo G, Ciocchi B, Lebenstedt M, Barazzoni R, Zanetti M, Platen P, Heer M & Guarnieri G. (2004). Short-term bed rest impairs amino acid-induced protein anabolism in humans. *The Journal of physiology* 558, 381-388.

Biolo G, Agostini F, Simunic B, Sturma M, Torelli L, Preiser JC, Deby-Dupont G, Magni P, Strollo F, di Prampero P, Guarnieri G, Mekjavic IB, Pisot R & Narici MV. (2008). Positive energy balance is associated with accelerated muscle atrophy and increased erythrocyte glutathione turnover during 5 wk of bed rest. *The American journal of clinical nutrition* 88, 950-958.

Bischoff R. (1986). A satellite cell mitogen from crushed adult muscle. *Developmental biology* 115, 140-147.

Blottner D, Salanova M, Puttmann B, Schiffl G, Felsenberg D, Buehring B & Rittweger J. (2006). Human skeletal muscle structure and function preserved by vibration muscle exercise following 55 days of bed rest. *European journal of applied physiology* 97, 261-271.

Boatright KM & Salvesen GS. (2003). Mechanisms of caspase activation. *Current opinion in cell biology* 15, 725-731.

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 (New York, NY* 294, 1704-1708.

Bodmer JL, Burns K, Schneider P, Hofmann K, Steiner V, Thome M, Bornand T, Hahne M, Schroter M, Becker K, Wilson A, French LE, Browning JL, MacDonald HR & Tschopp J. (1997). TRAMP, a novel apoptosis-mediating receptor with sequence homology to tumor necrosis factor receptor 1 and Fas(Apo-1/CD95). *Immunity* 6, 79-88.

Bohe J, Low JF, Wolfe RR & Rennie MJ. (2001). Latency and duration of stimulation of human muscle protein synthesis during continuous infusion of amino acids. *The Journal of physiology* 532, 575-579.

Boirie Y, Gachon P, Corny S, Fauquant J, Maubois JL & Beaufrere B. (1996). Acute postprandial changes in leucine metabolism as assessed with an intrinsically labeled milk protein. *The American journal of physiology* 271, E1083-1091.

Boirie Y, Gachon P & Beaufrere B. (1997). Splanchnic and whole-body leucine kinetics in young and elderly men. *The American journal of clinical nutrition* 65, 489-495.

Boirie Y. (2009). Physiopathological mechanism of sarcopenia. *The journal of nutrition, health & aging* 13, 717-723.

Bolster DR, Vary TC, Kimball SR & Jefferson LS. (2004). Leucine regulates translation initiation in rat skeletal muscle via enhanced eIF4G phosphorylation. *The Journal of nutrition* 134, 1704-1710.

Booth FW. (1978). Regrowth of atrophied skeletal muscle in adult rats after ending immobilization. *J Appl Physiol* 44, 225-230.

Booth FW & Seider MJ. (1979a). Early change in skeletal muscle protein synthesis after limb immobilization of rats. *J Appl Physiol* 47, 974-977.

Booth FW & Seider MJ. (1979b). Recovery of skeletal muscle after 3 mo of hindlimb immobilization in rats. *J Appl Physiol* 47, 435-439.

tel-00719700, version 1 - 20 Jul 2012

Booth FW. (1982). Effect of limb immobilization on skeletal muscle. *J Appl Physiol* 52, 1113-1118.

Booth FW & Criswell DS. (1997). Molecular events underlying skeletal muscle atrophy and the development of effective countermeasures. *International journal of sports medicine* 18 Suppl 4, S265-269.

Bos C, Stoll B, Fouillet H, Gaudichon C, Guan X, Grusak MA, Reeds PJ, Burrin DG & Tome D. (2005). Postprandial intestinal and whole body nitrogen kinetics and distribution in piglets fed a single meal. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 288**,** E436-446.

Bourdel-Marchasson I, Joseph PA, Dehail P, Biran M, Faux P, Rainfray M, Emeriau JP, Canioni P & Thiaudiere E. (2001). Functional and metabolic early changes in calf muscle occurring during nutritional repletion in malnourished elderly patients. *The American journal of clinical nutrition* 73, 832-838.

Bourdel-Marchasson I, Helmer C, Fagot-Campagna A, Dehail P & Joseph PA. (2007). Disability and quality of life in elderly people with diabetes. *Diabetes & metabolism* 33 Suppl 1, S66-74.

Bourdel-Marchasson I, Laksir H & Puget E. (2010). Interpreting routine biochemistry in those aged over 65 years: a time for change. *Maturitas* 66, 39-45

Brack AS, Bildsoe H & Hughes SM. (2005). Evidence that satellite cell decrement contributes to preferential decline in nuclear number from large fibres during murine age-related muscle atrophy. *Journal of cell science* 118, 4813-4821.

Braga M, Sinha Hikim AP, Datta S, Ferrini MG, Brown D, Kovacheva EL, Gonzalez-Cadavid NF & Sinha-Hikim I. (2008). Involvement of oxidative stress and caspase 2-mediated intrinsic pathway signaling in age-related increase in muscle cell apoptosis in mice. *Apoptosis* 13, 822-832.

Brault JJ, Jespersen JG & Goldberg AL. (2010). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1alpha or 1beta overexpression inhibits muscle protein degradation, induction of ubiquitin ligases, and disuse atrophy. *The Journal of biological chemistry* 285, 19460-19471.

Brooks NE, Schuenke MD & Hikida RS. (2009). No change in skeletal muscle satellite cells in young and aging rat soleus muscle. *J Physiol Sci* 59, 465-471.

Brown M & Hasser EM. (1996). Differential effects of reduced muscle use (hindlimb unweighting) on skeletal muscle with aging. *Aging (Milan, Italy)* 8, 99-105.

Bruce SA, Newton D & Woledge RC. (1989). Effect of age on voluntary force and cross-sectional area of human adductor pollicis muscle. *Quarterly journal of experimental physiology (Cambridge, England)* 74, 359-362.

Brunet A, Bonni A, Zigmond MJ, Lin MZ, Juo P, Hu LS, Anderson MJ, Arden KC, Blenis J & Greenberg ME. (1999). Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* 96, 857-868.

Brunet A, Sweeney LB, Sturgill JF, Chua KF, Greer PL, Lin Y, Tran H, Ross SE, Mostoslavsky R, Cohen HY, Hu LS, Cheng HL, Jedrychowski MP, Gygi SP, Sinclair DA, Alt FW & Greenberg ME. (2004). Stress-dependent regulation of FOXO transcription factors by the SIRT1 deacetylase. *Science (New York, NY* 303, 2011-2015.

Buford TW, Anton SD, Judge AR, Marzetti E, Wohlgemuth SE, Carter CS, Leeuwenburgh C, Pahor M & Manini TM. (2010). Models of accelerated sarcopenia: critical pieces for solving the puzzle of age-related muscle atrophy. *Ageing research reviews* 9, 369-383.

Buse MG & Reid SS. (1975). Leucine. A possible regulator of protein turnover in muscle. *The Journal of clinical investigation* 56, 1250-1261.

tel-00719700, version 1 - 20 Jul 2012

Busquets S, Alvarez B, Llovera M, Agell N, Lopez-Soriano FJ & Argiles JM. (2000). Branched-chain amino acids inhibit proteolysis in rat skeletal muscle: mechanisms involved. *Journal of cellular physiology* 184, 380-384.

Busquets S, Alvarez B, Lopez-Soriano FJ & Argiles JM. (2002). Branched-chain amino acids: a role in skeletal muscle proteolysis in catabolic states? *Journal of cellular physiology* 191, 283-289.

Cai D, Lee KK, Li M, Tang MK & Chan KM. (2004a). Ubiquitin expression is up-regulated in human and rat skeletal muscles during aging. *Archives of biochemistry and biophysics* 425, 42-50.

Cai D, Frantz JD, Tawa NE, Jr., Melendez PA, Oh BC, Lidov HG, Hasselgren PO, Frontera WR, Lee J, Glass DJ & Shoelson SE. (2004b). IKKbeta/NF-kappaB activation causes severe muscle wasting in mice. *Cell* 119, 285-298.

Cantini M, Massimino ML, Rapizzi E, Rossini K, Catani C, Dalla Libera L & Carraro U. (1995). Human satellite cell proliferation in vitro is regulated by autocrine secretion of IL-6 stimulated by a soluble factor(s) released by activated monocytes. *Biochemical and biophysical research communications* 216, 49-53.

Capel F, Buffiere C, Patureau Mirand P & Mosoni L. (2004). Differential variation of mitochondrial H2O2 release during aging in oxidative and glycolytic muscles in rats. *Mechanisms of ageing and development* 125, 367-373.

Capel F, Rimbert V, Lioger D, Diot A, Rousset P, Mirand PP, Boirie Y, Morio B & Mosoni L. (2005a). Due to reverse electron transfer, mitochondrial H2O2 release increases with age in human vastus lateralis muscle although oxidative capacity is preserved. *Mechanisms of ageing and development* 126, 505-511.

Capel F, Demaison L, Maskouri F, Diot A, Buffiere C, Patureau Mirand P & Mosoni L. (2005b). Calcium overload increases oxidative stress in old rat gastrocnemius muscle. *J Physiol Pharmacol* 56, 369-380.

Capel F, Prod'homme M, Bechet D, Taillandier D, Balage M, Attaix D & Combaret L. (2009). Lysosomal and proteasome-dependent proteolysis are differentially regulated by insulin and/or amino acids following feeding in young, mature and old rats. *The Journal of nutritional biochemistry* 20**,** 570-576.

Cardozo C, Vinitsky A, Michaud C & Orlowski M. (1994). Evidence that the nature of amino acid residues in the P3 position directs substrates to distinct catalytic sites of the pituitary multicatalytic proteinase complex (proteasome). *Biochemistry* 33, 6483-6489.

Carlberg U, Nilsson A & Nygard O. (1990). Functional properties of phosphorylated elongation factor 2. *European journal of biochemistry / FEBS* 191, 639-645.

Carlson ME, Suetta C, Conboy MJ, Aagaard P, Mackey A, Kjaer M & Conboy I. (2009). Molecular aging and rejuvenation of human muscle stem cells. *EMBO molecular medicine* 1, 381-391.

Carmeli E, Hochberg Z, Livne E, Lichtenstein I, Kestelboim C, Silbermann M & Reznick AZ. (1993). Effect of growth hormone on gastrocnemius muscle of aged rats after immobilization: biochemistry and morphology. *J Appl Physiol* 75, 1529-1535.

Caron AZ, Drouin G, Desrosiers J, Trensz F & Grenier G. (2009). A novel hindlimb immobilization procedure for studying skeletal muscle atrophy and recovery in mouse. *J Appl Physiol* 106, 2049-2059.

tel-00719700, version 1 - 20 Jul 2012

Carroll CC, Fluckey JD, Williams RH, Sullivan DH & Trappe TA. (2005). Human soleus and vastus lateralis muscle protein metabolism with an amino acid infusion. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 288, E479-485.

Cayot P & Lorient D. (1998). Structures et technofonctions des protéines du lait *Tec & Doc (Editions)*.

Chakravarthy MV, Davis BS & Booth FW. (2000). IGF-I restores satellite cell proliferative potential in immobilized old skeletal muscle. *J Appl Physiol* 89, 1365-1379.

Chandran R, Knobloch TJ, Anghelina M & Agarwal S. (2007). Biomechanical signals upregulate myogenic gene induction in the presence or absence of inflammation. *American journal of physiology* 293, C267-276.

Chao DT & Korsmeyer SJ. (1998). BCL-2 family: regulators of cell death. *Annual review of immunology* 16, 395-419.

Charge SB & Rudnicki MA. (2004). Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiological reviews* 84, 209-238.

Chen JC & Goldhamer DJ. (2003). Skeletal muscle stem cells. *Reprod Biol Endocrinol* 1, 101.

Chen YW, Gregory CM, Scarborough MT, Shi R, Walter GA & Vandenborne K. (2007). Transcriptional pathways associated with skeletal muscle disuse atrophy in humans. *Physiological genomics* 31, 510-520.

Childs TE, Spangenburg EE, Vyas DR & Booth FW. (2003). Temporal alterations in protein signaling cascades during recovery from muscle atrophy. *American journal of physiology* 285, C391-398.

Chipuk JE, Kuwana T, Bouchier-Hayes L, Droin NM, Newmeyer DD, Schuler M & Green DR. (2004). Direct activation of Bax by p53 mediates mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis. *Science (New York, NY* 303, 1010-1014.

Chung L & Ng YC. (2006). Age-related alterations in expression of apoptosis regulatory proteins and heat shock proteins in rat skeletal muscle. *Biochimica et biophysica acta* 1762, 103-109.

Clavel S, Coldefy AS, Kurkdjian E, Salles J, Margaritis I & Derijard B. (2006). Atrophy-related ubiquitin ligases, atrogin-1 and MuRF1 are up-regulated in aged rat Tibialis Anterior muscle. *Mechanisms of ageing and development* 127, 794-801.

Clarke BA, Drujan D, Willis MS, Murphy LO, Corpina RA, Burova E, Rakhilin SV, Stitt TN, Patterson C, Latres E & Glass DJ. (2007). The E3 Ligase MuRF1 degrades myosin heavy chain protein in dexamethasone-treated skeletal muscle. *Cell metabolism* 6**,** 376-385.

Cohen GM. (1997). Caspases: the executioners of apoptosis. *The Biochemical journal* 326 (Pt 1), 1-16.

Cohen S, Brault JJ, Gygi SP, Glass DJ, Valenzuela DM, Gartner C, Latres E & Goldberg AL. (2009). During muscle atrophy, thick, but not thin, filament components are degraded by MuRF1-dependent ubiquitylation. *The Journal of cell biology* 185**,** 1083-1095.

Cohn SH, Vartsky D, Yasumura S, Sawitsky A, Zanzi I, Vaswani A & Ellis KJ. (1980). Compartmental body composition based on total-body nitrogen, potassium, and calcium. *The American journal of physiology* 239, E524-530.

Combaret L, Taillandier D, Dardevet D, Bechet D, Ralliere C, Claustre A, Grizard J & Attaix D. (2004). Glucocorticoids regulate mRNA levels for subunits of the 19 S regulatory complex of the 26 S proteasome in fast-twitch skeletal muscles. *The Biochemical journal* 378, 239-246.

Combaret L, Dardevet D, Rieu I, Pouch MN, Bechet D, Taillandier D, Grizard J & Attaix D. (2005). A leucine-supplemented diet restores the defective postprandial inhibition of

tel-00719700, version 1 - 20 Jul 2012

proteasome-dependent proteolysis in aged rat skeletal muscle. *The Journal of physiology* 569, 489-499.

Combaret L, Dardevet D, Bechet D, Taillandier D, Mosoni L & Attaix D. (2009). Skeletal muscle proteolysis in aging. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care* 12, 37-41.

Conboy IM, Conboy MJ, Smythe GM & Rando TA. (2003). Notch-mediated restoration of regenerative potential to aged muscle. *Science (New York, NY* 302, 1575-1577.

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

Cory S & Adams JM. (2002). The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer* 2, 647-656.

Coutinho EL, Gomes AR, Franca CN, Oishi J & Salvini TF. (2004). Effect of passive stretching on the immobilized soleus muscle fiber morphology. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas / Sociedade Brasileira de Biofisica [et al* 37, 1853-1861.

Coux O, Tanaka K & Goldberg AL. (1996). Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes. *Annual review of biochemistry* 65, 801-847.

Crompton M, Virji S & Ward JM. (1998). Cyclophilin-D binds strongly to complexes of the voltage-dependent anion channel and the adenine nucleotide translocase to form the permeability transition pore. *European journal of biochemistry / FEBS* 258, 729-735.

Crowe AV, McArdle A, McArdle F, Pattwell DM, Bell GM, Kemp GJ, Bone JM, Griffiths RD & Jackson MJ. (2007). Markers of oxidative stress in the skeletal muscle of patients on haemodialysis. *Nephrol Dial Transplant* 22, 1177-1183.

Crozier SJ, Kimball SR, Emmert SW, Anthony JC & Jefferson LS. (2005). Oral leucine administration stimulates protein synthesis in rat skeletal muscle. *The Journal of nutrition* 135, 376-382.

Cruz-Jentoft AJ, Baeyens JP, Bauer JM, Boirie Y, Cederholm T, Landi F, Martin FC, Michel JP, Rolland Y, Schneider SM, Topinkova E, Vandewoude M & Zamboni M. (2010). Sarcopenia: European consensus on definition and diagnosis: Report of the European Working Group on Sarcopenia in Older People. *Age and ageing* 39, 412-423.

Csibi A, Leibovitch MP, Cornille K, Tintignac LA & Leibovitch SA. (2009). MAFbx/Atrogin-1 controls the activity of the initiation factor eIF3-f in skeletal muscle atrophy by targeting multiple C-terminal lysines. *The Journal of biological chemistry* 284, 4413-4421.

Cuthbertson D, Smith K, Babraj J, Leese G, Waddell T, Atherton P, Wackerhage H, Taylor PM & Rennie MJ. (2005). Anabolic signaling deficits underlie amino acid resistance of wasting, aging muscle. *Faseb J* 19, 422-424.

Dalla Libera L, Ravara B, Gobbo V, Tarricone E, Vitadello M, Biolo G, Vescovo G & Gorza L. (2009). A transient antioxidant stress response accompanies the onset of disuse atrophy in human skeletal muscle. *J Appl Physiol* 107, 549-557.

Dangin M, Boirie Y, Garcia-Rodenas C, Gachon P, Fauquant J, Callier P, Ballevre O & Beaufrere B. (2001). The digestion rate of protein is an independent regulating factor of postprandial protein retention. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 280, E340-348.

Dangin M, Guillet C, Garcia-Rodenas C, Gachon P, Bouteloup-Demange C, Reiffers-Magnani K, Fauquant J, Ballevre O & Beaufrere B. (2003). The rate of protein digestion affects protein gain differently during aging in humans. *The Journal of physiology* 549, 635-644.

tel-00719700, version 1 - 20 Jul 2012

Danial NN & Korsmeyer SJ. (2004). Cell death: critical control points. *Cell* 116, 205-219.

Dardevet D, Sornet C, Attaix D, Baracos VE & Grizard J. (1994). Insulin-like growth factor-1 and insulin resistance in skeletal muscles of adult and old rats. *Endocrinology* 134, 1475-1484.

Dardevet D, Sornet C, Taillandier D, Savary I, Attaix D & Grizard J. (1995). Sensitivity and protein turnover response to glucocorticoids are different in skeletal muscle from adult and old rats. Lack of regulation of the ubiquitin-proteasome proteolytic pathway in aging. *The Journal of clinical investigation* 96, 2113-2119.

Dardevet D, Sornet C, Balage M & Grizard J. (2000). Stimulation of in vitro rat muscle protein synthesis by leucine decreases with age. *The Journal of nutrition* 130, 2630-2635.

Dardevet D, Sornet C, Bayle G, Prugnaud J, Pouyet C & Grizard J. (2002). Postprandial stimulation of muscle protein synthesis in old rats can be restored by a leucine-supplemented meal. *The Journal of nutrition* 132, 95-100.

Dardevet D, Rieu I, Fafournoux P, Sornet C, Combaret L, Bruhat A, Mordier S, Mosoni L & Grizard J. (2003). Leucine: a key amino acid in ageing-associated sarcopenia? *Nutrition research reviews* 16, 61-70.

Dardevet D, Rémond D & Mosoni L. (2011). Les protéines laitières : la source protéique à privilégier pour maintenir le capital musculaire des personnes âgées ? *Innovations Agronomiques* 13, 45-55.

Dargelos E, Brule C, Combaret L, Hadj-Sassi A, Dulong S, Poussard S & Cottin P. (2007). Involvement of the calcium-dependent proteolytic system in skeletal muscle aging. *Experimental gerontology* 42, 1088-1098.

Dargelos E, Poussard S, Brule C, Daury L & Cottin P. (2008). Calcium-dependent proteolytic system and muscle dysfunctions: a possible role of calpains in sarcopenia. *Biochimie* 90, 359-368.

Daugas E, Nochy D, Ravagnan L, Loeffler M, Susin SA, Zamzami N & Kroemer G. (2000). Apoptosis-inducing factor (AIF): a ubiquitous mitochondrial oxidoreductase involved in apoptosis. *FEBS letters* 476, 118-123.

de Boer MD, Selby A, Atherton P, Smith K, Seynnes OR, Maganaris CN, Maffulli N, Movin T, Narici MV & Rennie MJ. (2007). The temporal responses of protein synthesis, gene expression and cell signalling in human quadriceps muscle and patellar tendon to disuse. *The Journal of physiology* 585, 241-251.

de Boer MD, Seynnes OR, di Prampero PE, Pisot R, Mekjavic IB, Biolo G & Narici MV. (2008). Effect of 5 weeks horizontal bed rest on human muscle thickness and architecture of weight bearing and non-weight bearing muscles. *European journal of applied physiology* 104, 401-407.

Dehail P & Bourdel-Marchasson I. (2001). Le vieillissement musculaire : conséquences fonctionnelles, évaluation, prise en charge rééducative. *La Revue de gériatrie* 26, 577–584.

Deruisseau KC, Kavazis AN & Powers SK. (2005). Selective downregulation of ubiquitin conjugation cascade mRNA occurs in the senescent rat soleus muscle. *Experimental gerontology* 40, 526-531.

Deval C, Mordier S, Obled C, Bechet D, Combaret L, Attaix D & Ferrara M. (2001). Identification of cathepsin L as a differentially expressed message associated with skeletal muscle wasting. *The Biochemical journal* 360, 143-150.

Deveraux QL & Reed JC. (1999). IAP family proteins--suppressors of apoptosis. *Genes & development* 13, 239-252.

Dirks A & Leeuwenburgh C. (2002). Apoptosis in skeletal muscle with aging. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 282, R519-527.

tel-00719700, version 1 - 20 Jul 2012

Dirks AJ & Leeuwenburgh C. (2004). Aging and lifelong calorie restriction result in adaptations of skeletal muscle apoptosis repressor, apoptosis-inducing factor, X-linked inhibitor of apoptosis, caspase-3, and caspase-12. *Free radical biology & medicine* 36, 27-39.

Doherty TJ, Vandervoort AA, Taylor AW & Brown WF. (1993). Effects of motor unit losses on strength in older men and women. *J Appl Physiol* 74, 868-874. editors. Human muscle power. Human Kinetics, Champaign, I11. . 81–94.

Dreyer HC & Volpi E. (2005). Role of protein and amino acids in the pathophysiology and treatment of sarcopenia. *Journal of the American College of Nutrition* 24, 140S-145S.

Drummond GB. (2009). Reporting ethical matters in the Journal of Physiology: standards and advice. *The Journal of physiology* 587, 713-719.

Du C, Fang M, Li Y, Li L & Wang X. (2000). Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* 102, 33-42.

Dunn WA, Jr. (1990a). Studies on the mechanisms of autophagy: maturation of the autophagic vacuole. *The Journal of cell biology* 110, 1935-1945.

Dunn WA, Jr. (1990b). Studies on the mechanisms of autophagy: formation of the autophagic vacuole. *The Journal of cell biology* 110, 1923-1933.

Dupont-Versteegden EE, Fluckey JD, Knox M, Gaddy D & Peterson CA. (2006). Effect of flywheel-based resistance exercise on processes contributing to muscle atrophy during unloading in adult rats. *J Appl Physiol* 101, 202-212.

Edstrom E, Altun M, Hagglund M & Ulfhake B. (2006). Atrogin-1/MAFbx and MuRF1 are downregulated in aging-related loss of skeletal muscle. *The journals of gerontology* 61, 663-674.

English KL & Paddon-Jones D. (2010). Protecting muscle mass and function in older adults during bed rest. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care* 13, 34-39.

Essers MA, Weijzen S, de Vries-Smits AM, Saarloos I, de Ruiter ND, Bos JL & Burgering BM. (2004). FOXO transcription factor activation by oxidative stress mediated by the small GTPase Ral and JNK. *The EMBO journal* 23, 4802-4812.

Fan J, Xu G, Xu J, Wang C & Ma L. (2000). Caspase 3 in the cytokines induced acute leukemia cell apoptosis. *Zhonghua xue ye xue za zhi = Zhonghua xueyexue zazhi* 21, 305-308.

Fares FA, Gruener N, Carmeli E & Reznick AZ. (1996). Growth hormone (GH) retardation of muscle damage due to immobilization in old rats. Possible intervention with a new long-acting recombinant GH. *Annals of the New York Academy of Sciences* 786, 430-443.

Farid M, Reid MB, Li YP, Gerken E & Durham WJ. (2005). Effects of dietary curcumin or N-acetylcysteine on NF-kappaB activity and contractile performance in ambulatory and unloaded murine soleus. *Nutrition & metabolism* 2, 20.

Faulkner JA, Claflin DR & McCully KK. (1986). Power output of fast and slow fibres from skeletal muscles. In: Jones NL, McCartney N, McComas AJ,editors. Human muscle power. Human Kinetics, Champaign, I11. 81–94.

Favier FB, Benoit H & Freyssenet D. (2008). Cellular and molecular events controlling skeletal muscle mass in response to altered use. *Pflugers Arch* 456**,** 587-600.

Fernando P, Kelly JF, Balazsi K, Slack RS & Megeney LA. (2002). Caspase 3 activity is required for skeletal muscle differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 11025-11030.

tel-00719700, version 1 - 20 Jul 2012

Ferrando AA, Lane HW, Stuart CA, Davis-Street J & Wolfe RR. (1996). Prolonged bed rest decreases skeletal muscle and whole body protein synthesis. *The American journal of physiology* 270, E627- 633.

Ferrando AA, Paddon-Jones D, Hays NP, Kortebein P, Ronsen O, Williams RH, McComb A, Symons TB, Wolfe RR & Evans W. (2010). EAA supplementation to increase nitrogen intake improves muscle function during bed rest in the elderly. *Clinical nutrition (Edinburgh, Scotland)* 29, 18-23.

Ferreira R, Neuparth MJ, Vitorino R, Appell HJ, Amado F & Duarte JA. (2008). Evidences of apoptosis during the early phases of soleus muscle atrophy in hindlimb suspended mice. *Physiological research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca* 57, 601-611.

Ferrington DA, Husom AD & Thompson LV. (2005). Altered proteasome structure, function, and oxidation in aged muscle. *Faseb J* 19, 644-646.

Fineschi B & Miller J. (1997). Endosomal proteases and antigen processing. *Trends in biochemical sciences* 22, 377-382.

Fitts RH, Desplanches D, Romatowski JG & Widrick JJ. (2000). Spaceflight effects on single skeletal muscle fiber function in the rhesus monkey. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 279, R1546-1557.

Flynn MA, Nolph GB, Baker AS, Martin WM & Krause G. (1989). Total body potassium in aging humans: a longitudinal study. *The American journal of clinical nutrition* 50, 713-717.

Frexes-Steed M, Lacy DB, Collins J & Abumrad NN. (1992). Role of leucine and other amino acids in regulating protein metabolism in vivo. *The American journal of physiology* 262, E925-935.

Fried LP, Tangen CM, Walston J, Newman AB, Hirsch C, Gottdiener J, Seeman T, Tracy R, Kop WJ, Burke G & McBurnie MA. (2001). Frailty in older adults: evidence for a phenotype. *The journals of gerontology* 56, M146-156.

Fromentin C, Azzout-Marniche D, Tome D, Even P, Luengo C, Piedcoq J, Fromentin G & Gaudichon C. (2011). The postprandial use of dietary amino acids as an energy substrate is delayed after the deamination process in rats adapted for 2 weeks to a high protein diet. *Amino acids* 40, 1461-1472.

Frontera WR, Suh D, Krivickas LS, Hughes VA, Goldstein R & Roubenoff R. (2000). Skeletal muscle fiber quality in older men and women. *American journal of physiology* 279, C611-618.

Frontera WR, Reid KF, Phillips EM, Krivickas LS, Hughes VA, Roubenoff R & Fielding RA. (2008). Muscle fiber size and function in elderly humans: a longitudinal study. *J Appl Physiol* 105, 637-642.

Frost RA, Lang CH & Gelato MC. (1997). Transient exposure of human myoblasts to tumor necrosis factor-alpha inhibits serum and insulin-like growth factor-I stimulated protein synthesis. *Endocrinology* 138, 4153-4159.

Frost RA, Nystrom GJ & Lang CH. (2003). Tumor necrosis factor-alpha decreases insulin-like growth factor-I messenger ribonucleic acid expression in C2C12 myoblasts via a Jun N-terminal kinase pathway. *Endocrinology* 144, 1770-1779.

Fruhbeck G, Muguerza B, Castilla-Cortazar I & Santidrian S. (1996). Effect of aging on the rate of muscle protein turnover in rat. *Revista espanola de fisiologia* 52, 207-214.

Fuentes-Prior P & Salvesen GS. (2004). The protein structures that shape caspase activity, specificity, activation and inhibition. *The Biochemical journal* 384, 201-232.

tel-00719700, version 1 - 20 Jul 2012

Fujita S, Dreyer HC, Drummond MJ, Glynn EL, Cadenas JG, Yoshizawa F, Volpi E & Rasmussen BB. (2007). Nutrient signalling in the regulation of human muscle protein synthesis. *The Journal of physiology* 582, 813-823.

Fujita S, Glynn EL, Timmerman KL, Rasmussen BB & Volpi E. (2009). Supraphysiological hyperinsulinaemia is necessary to stimulate skeletal muscle protein anabolism in older adults: evidence of a true age-related insulin resistance of muscle protein metabolism. *Diabetologia* 52, 1889-1898.

Fulks RM, Li JB & Goldberg AL. (1975). Effects of insulin, glucose, and amino acids on protein turnover in rat diaphragm. *The Journal of biological chemistry* 250, 290-298.

Furukawa-Hibi Y, Yoshida-Araki K, Ohta T, Ikeda K & Motoyama N. (2002). FOXO forkhead transcription factors induce G(2)-M checkpoint in response to oxidative stress. *The Journal of biological chemistry* 277, 26729-26732.

Gallagher D, Visser M, De Meersman RE, Sepulveda D, Baumgartner RN, Pierson RN, Harris T & Heymsfield SB. (1997). Appendicular skeletal muscle mass: effects of age, gender, and ethnicity. *J Appl Physiol* 83, 229-239.

Gallagher D, Ruts E, Visser M, Heshka S, Baumgartner RN, Wang J, Pierson RN, Pi-Sunyer FX & Heymsfield SB. (2000). Weight stability masks sarcopenia in elderly men and women. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 279, E366-375.

Gallegly JC, Turesky NA, Strotman BA, Gurley CM, Peterson CA & Dupont-Versteegden EE. (2004). Satellite cell regulation of muscle mass is altered at old age. *J Appl Physiol* 97, 1082-1090.

Galvez AS, Diwan A, Odley AM, Hahn HS, Osinska H, Melendez JG, Robbins J, Lynch RA, Marreez Y & Dorn GW, 2nd. (2007). Cardiomyocyte degeneration with calpain deficiency reveals a critical role in protein homeostasis. *Circulation research* 100, 1071-1078.

Garlick PJ & Grant I. (1988). Amino acid infusion increases the sensitivity of muscle protein synthesis in vivo to insulin. Effect of branched-chain amino acids. *The Biochemical journal* 254, 579-584.

Garlick PJ. (2005). The role of leucine in the regulation of protein metabolism. *The Journal of nutrition* 135, 1553S-1556S.

Gayraud-Morel B, Chretien F, Flamant P, Gomes D, Zammit PS & Tajbakhsh S. (2007). A role for the myogenic determination gene Myf5 in adult regenerative myogenesis. *Developmental biology* 312, 13-28.

Gibson JN, Halliday D, Morrison WL, Stoward PJ, Hornsby GA, Watt PW, Murdoch G & Rennie MJ. (1987). Decrease in human quadriceps muscle protein turnover consequent upon leg immobilization. *Clin Sci (Lond)* 72, 503-509.

Giresi PG, Stevenson EJ, Theilhaber J, Koncarevic A, Parkington J, Fielding RA & Kandarian SC. (2005). Identification of a molecular signature of sarcopenia. *Physiological genomics* 21, 253-263.

Glass DJ. (2005). Skeletal muscle hypertrophy and atrophy signaling pathways. *The international journal of biochemistry & cell biology* 37, 1974-1984.

Glover EI, Phillips SM, Oates BR, Tang JE, Tarnopolsky MA, Selby A, Smith K & Rennie MJ. (2008). Immobilization induces anabolic resistance in human myofibrillar protein synthesis with low and high dose amino acid infusion. *The Journal of physiology* 586, 6049-6061.

Glover EI, Yasuda N, Tarnopolsky MA, Abadi A & Phillips SM. (2010). Little change in markers of protein breakdown and oxidative stress in humans in immobilization-induced skeletal

tel-00719700, version 1 - 20 Jul 2012

muscle atrophy. *Applied physiology, nutrition, and metabolism = Physiologie appliquee, nutrition et metabolisme* 35, 125-133.

Goldspink DF. (1976). The effects of denervation on protein turnover of rat skeletal muscle. *The Biochemical journal* 156, 71-80.

Goldspink DF. (1977a). The influence of immobilization and stretch on protein turnover of rat skeletal muscle. *The Journal of physiology* 264, 267-282.

Goldspink DF. (1977b). The influence of activity on muscle size and protein turnover. *The Journal of physiology* 264, 283-296.

Goldspink DF, Morton AJ, Loughna P & Goldspink G. (1986). The effect of hypokinesia and hypodynamia on protein turnover and the growth of four skeletal muscles of the rat. *Pflugers Arch* 407, 333-340.

Goll DE, Thompson VF, Li H, Wei W & Cong J. (2003). The calpain system. *Physiological reviews* 83, 731-801.

Green DR & Kroemer G. (2004). The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science (New York, NY* 305, 626-629.

Greenlund LJ & Nair KS. (2003). Sarcopenia--consequences, mechanisms, and potential therapies. *Mechanisms of ageing and development* 124, 287-299.

Greer EL & Brunet A. (2005). FOXO transcription factors at the interface between longevity and tumor suppression. *Oncogene* 24, 7410-7425.

Greiwe JS, Kwon G, McDaniel ML & Semenkovich CF. (2001). Leucine and insulin activate p70 S6 kinase through different pathways in human skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 281, E466-471.

Grounds MD. (1998). Age-associated changes in the response of skeletal muscle cells to exercise and regeneration. *Annals of the New York Academy of Sciences* 854, 78-91.

Guillet C, Prod'homme M, Balage M, Gachon P, Giraudet C, Morin L, Grizard J & Boirie Y. (2004a). Impaired anabolic response of muscle protein synthesis is associated with S6K1 dysregulation in elderly humans. *Faseb J* 18, 1586-1587.

Guillet C, Zangarelli A, Mishellany A, Rousset P, Sornet C, Dardevet D & Boirie Y. (2004b). Mitochondrial and sarcoplasmic proteins, but not myosin heavy chain, are sensitive to leucine supplementation in old rat skeletal muscle. *Experimental gerontology* 39, 745-751.

Guillet C & Boirie Y. (2005). Insulin resistance: a contributing factor to age-related muscle mass loss? *Diabetes & metabolism* 31 Spec No 2, 5S20-25S26.

Guillot C, Steinberg JG, Delliaux S, Kipson N, Jammes Y & Badier M. (2008). Physiological, histological and biochemical properties of rat skeletal muscles in response to hindlimb suspension. *J Electromyogr Kinesiol* 18, 276-283.

Gur H, Gransberg L, vanDyke D, Knutsson E & Larsson L. (2003). Relationship between in vivo muscle force at different speeds of isokinetic movements and myosin isoform expression in men and women. *European journal of applied physiology* 88, 487-496.

Guttridge DC, Mayo MW, Madrid LV, Wang CY & Baldwin AS, Jr. (2000). NF-kappaB-induced loss of MyoD messenger RNA: possible role in muscle decay and cachexia. *Science (New York, NY* 289, 2363-2366.

Gwag T, Lee K, Ju H, Shin H, Lee JW & Choi I. (2009). Stress and signaling responses of rat skeletal muscle to brief endurance exercise during hindlimb unloading: a catch-up process for atrophied muscle. *Cell Physiol Biochem* 24, 537-546.

tel-00719700, version 1 - 20 Jul 2012

Haddad F & Adams GR. (2006). Aging-sensitive cellular and molecular mechanisms associated with skeletal muscle hypertrophy. *J Appl Physiol* 100, 1188-1203.

Haldar S, Negrini M, Monne M, Sabbioni S & Croce CM. (1994). Down-regulation of bcl-2 by p53 in breast cancer cells. *Cancer research* 54, 2095-2097.

Hamel FG, Upward JL, Siford GL & Duckworth WC. (2003). Inhibition of proteasome activity by selected amino acids. *Metabolism: clinical and experimental* 52, 810-814.

Hamer M & Molloy GJ. (2009). Association of C-reactive protein and muscle strength in the English Longitudinal Study of Ageing. *Age (Dordrecht, Netherlands)* 31, 171-177.

Hasselgren PO & Fischer JE. (2001). Muscle cachexia: current concepts of intracellular mechanisms and molecular regulation. *Annals of surgery* 233, 9-17.

Hasten DL, Pak-Loduca J, Obert KA & Yarasheski KE. (2000). Resistance exercise acutely increases MHC and mixed muscle protein synthesis rates in 78-84 and 23-32 yr olds. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 278, E620-626.

Hawke TJ & Garry DJ. (2001). Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology. *J Appl Physiol* 91, 534-551.

Haylett T & Thilo L. (1991). Endosome-lysosome fusion at low temperature. *The Journal of biological chemistry* 266, 8322-8327.

Herningtyas EH, Okimura Y, Handayaningsih AE, Yamamoto D, Maki T, Iida K, Takahashi Y, Kaji H & Chihara K. (2008). Branched-chain amino acids and arginine suppress MaFbx/atrogin-1 mRNA expression via mTOR pathway in C2C12 cell line. *Biochimica et biophysica acta* 1780, 1115-1120.

Hiona A & Leeuwenburgh C. (2008). The role of mitochondrial DNA mutations in aging and sarcopenia: implications for the mitochondrial vicious cycle theory of aging. *Experimental gerontology* 43, 24-33.

Hitomi J, Katayama T, Taniguchi M, Honda A, Imaizumi K & Tohyama M. (2004). Apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress depends on activation of caspase-3 via caspase-12. *Neuroscience letters* 357, 127-130.

Hollman JH, Kovash FM, Kubik JJ & Linbo RA. (2007). Age-related differences in spatiotemporal markers of gait stability during dual task walking. *Gait & posture* 26, 113-119.

Holloszy JO, Chen M, Cartee GD & Young JC. (1991). Skeletal muscle atrophy in old rats: differential changes in the three fiber types. *Mechanisms of ageing and development* 60, 199-213.

Holtzman E. (1989). Lysosomes. *New York: Plenum Press*.

Hong SO & Layman DK. (1984). Effects of leucine on in vitro protein synthesis and degradation in rat skeletal muscles. *The Journal of nutrition* 114, 1204-1212.

Hoppeler H. (1986). Exercise-induced ultrastructural changes in skeletal muscle. *International journal of sports medicine* 7, 187-204.

Hornberger TA, Hunter RB, Kandarian SC & Esser KA. (2001). Regulation of translation factors during hindlimb unloading and denervation of skeletal muscle in rats. *American journal of physiology* 281, C179-187.

Hornberger TA, Sukhija KB, Wang XR & Chien S. (2007). mTOR is the rapamycin-sensitive kinase that confers mechanically-induced phosphorylation of the hydrophobic motif site Thr(389) in p70(S6k). *FEBS letters* 581, 4562-4566.

tel-00719700, version 1 - 20 Jul 2012

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. *The Journal of physiology* 524 Pt 1, 293-304.

Howard C, Ferrucci L, Sun K, Fried LP, Walston J, Varadhan R, Guralnik JM & Semba RD. (2007). Oxidative protein damage is associated with poor grip strength among older women living in the community. *J Appl Physiol* 103, 17-20.

Hsu H, Xiong J & Goeddel DV. (1995). The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation. *Cell* 81, 495-504.

Huang J & Fo Mitch WE & Goldberg AL. (1996). Mechanisms of muscle wasting. The role of the ubiquitin-proteasome pathway. *The New England journal of medicine* 335, 1897-1905.

Huang J & Forsberg NE. (1998). Role of calpain in skeletal-muscle protein degradation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95**,** 12100-12105.

Hughes VA, Frontera WR, Wood M, Evans WJ, Dallal GE, Roubenoff R & Fiatarone Singh MA. (2001). Longitudinal muscle strength changes in older adults: influence of muscle mass, physical activity, and health. *The journals of gerontology* 56, B209-217.

Hunter RB, Stevenson E, Koncarevic A, Mitchell-Felton H, Essig DA & Kandarian SC. (2002). Activation of an alternative NF-kappaB pathway in skeletal muscle during disuse atrophy. *Faseb J* 16, 529-538.

Hunter RB & Kandarian SC. (2004). Disruption of either the Nfkb1 or the Bcl3 gene inhibits skeletal muscle atrophy. *The Journal of clinical investigation* 114, 1504-1511.

Husom AD, Peters EA, Kolling EA, Fugere NA, Thompson LV & Ferrington DA. (2004). Altered proteasome function and subunit composition in aged muscle. *Archives of biochemistry and biophysics* 421, 67-76.

Hvid L, Aagaard P, Justesen L, Bayer ML, Andersen JL, Ortenblad N, Kjaer M & Suetta C. (2010). Effects of aging on muscle mechanical function and muscle fiber morphology during short-term immobilization and subsequent retraining. *J Appl Physiol* 109, 1628-1634.

Hyun DH, Hernandez JO, Mattson MP & de Cabo R. (2006). The plasma membrane redox system in aging. *Ageing research reviews* 5, 209-220.

Iannuzzi-Sucich M, Prestwood KM & Kenny AM. (2002). Prevalence of sarcopenia and predictors of skeletal muscle mass in healthy, older men and women. *The journals of gerontology* 57, M772-777.

Ikemoto M, Nikawa T, Takeda S, Watanabe C, Kitano T, Baldwin KM, Izumi R, Nonaka I, Towatari T, Teshima S, Rokutan K & Kishi K. (2001). Space shuttle flight (STS-90) enhances degradation of rat myosin heavy chain in association with activation of ubiquitin-proteasome pathway. *Faseb J* 15, 1279-1281.

Ikezoe T, Mori N, Nakamura M & Ichihashi N. (2010a). Age-related muscle atrophy in the lower extremities and daily physical activity in elderly women. *Archives of gerontology and geriatrics* 53, e153-157.

Ikezoe T, Mori N, Nakamura M & Ichihashi N. (2010b). Atrophy of the lower limbs in elderly women: is it related to walking ability? *European journal of applied physiology* 111, 989-995.

Inoki K, Li Y, Zhu T, Wu J & Guan KL. (2002). TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling. *Nature cell biology* 4, 648-657.

tel-00719700, version 1 - 20 Jul 2012

INSEE (Isabelle Robert-Bobée). (2007). Projections de population 2005-2050, pour la France métropolitaine. *ÉCONOMIE ET STATISTIQUE* 408-409, 95-112.

Isfort RJ, Wang F, Greis KD, Sun Y, Keough TW, Farrar RP, Bodine SC & Anderson NL. (2002). Proteomic analysis of rat soleus muscle undergoing hindlimb suspension-induced atrophy and reweighting hypertrophy. *Proteomics* 2, 543-550.

Jackman RW & Kandarian SC. (2004). The molecular basis of skeletal muscle atrophy. *American journal of physiology* 287, C834-843.

Janssen I, Heymsfield SB, Wang ZM & Ross R. (2000). Skeletal muscle mass and distribution in 468 men and women aged 18-88 yr. *J Appl Physiol* 89, 81-88.

Janssen I, Heymsfield SB & Ross R. (2002). Low relative skeletal muscle mass (sarcopenia) in older persons is associated with functional impairment and physical disability. *Journal of the American Geriatrics Society* 50, 889-896.

Janssen I, Baumgartner RN, Ross R, Rosenberg IH & Roubenoff R. (2004). Skeletal muscle cutpoints associated with elevated physical disability risk in older men and women. *American journal of epidemiology* 159, 413-421.

Janssen I, Shepard DS, Katzmarzyk PT & Roubenoff R. (2004a). The healthcare costs of sarcopenia in the United States. *Journal of the American Geriatrics Society* 52, 80-85.

Jarvinen TA, Jozsa L, Kannus P, Jarvinen TL & Jarvinen M. (2002). Organization and distribution of intramuscular connective tissue in normal and immobilized skeletal muscles. An immunohistochemical, polarization and scanning electron microscopic study. *Journal of muscle research and cell motility* 23, 245-254.

Jaspers SR & Tischler ME. (1984). Atrophy and growth failure of rat hindlimb muscles in tail-cast suspension. *J Appl Physiol* 57, 1472-1479.

Jastrzebski K, Hannan KM, Tchoubrieva EB, Hannan RD & Pearson RB. (2007). Coordinate regulation of ribosome biogenesis and function by the ribosomal protein S6 kinase, a key mediator of mTOR function. *Growth factors (Chur, Switzerland)* 25, 209-226.

Jejurikar SS, Henkelman EA, Cederna PS, Marcelo CL, Urbanchek MG & Kuzon WM, Jr. (2006). Aging increases the susceptibility of skeletal muscle derived satellite cells to apoptosis. *Experimental gerontology* 41, 828-836.

Jeong SY & Seol DW. (2008). The role of mitochondria in apoptosis. *BMB reports* 41, 11-22.

Jette AM & Branch LG. (1981). The Framingham Disability Study: II. Physical disability among the aging. *American journal of public health* 71, 1211-1216.

Ji LL, Gomez-Cabrera MC & Vina J. (2006). Exercise and hormesis: activation of cellular antioxidant signaling pathway. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1067, 425-435.

Jones SW, Hill RJ, Krasney PA, O'Conner B, Peirce N & Greenhaff PL. (2004). Disuse atrophy and exercise rehabilitation in humans profoundly affects the expression of genes associated with the regulation of skeletal muscle mass. *Faseb J* 18, 1025-1027.

Jourdan M, Cynober L, Moinard C, Blanc MC, Neveux N, De Bandt JP & Aussel C. (2008). Splanchnic sequestration of amino acids in aged rats: in vivo and ex vivo experiments using a model of isolated perfused liver. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 294, R748-755.

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.

tel-00719700, version 1 - 20 Jul 2012

Judge AR, Koncarevic A, Hunter RB, Liou HC, Jackman RW & Kandarian SC. (2007). Role for IkappaBalpha, but not c-Rel, in skeletal muscle atrophy. *American journal of physiology* 292, C372-382.

Kabeya Y, Mizushima N, Ueno T, Yamamoto A, Kirisako T, Noda T, Kominami E, Ohsumi Y & Yoshimori T. (2000). LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *The EMBO journal* 19, 5720-5728.

Kadi F, Charifi N, Denis C & Lexell J. (2004). Satellite cells and myonuclei in young and elderly women and men. *Muscle & nerve* 29, 120-127.

Kadi F, Charifi N, Denis C, Lexell J, Andersen JL, Schjerling P, Olsen S & Kjaer M. (2005). The behaviour of satellite cells in response to exercise: what have we learned from human studies? *Pflugers Arch* 451, 319-327.

Kandarian SC & Stevenson EJ. (2002). Molecular events in skeletal muscle during disuse atrophy. *Exercise and sport sciences reviews* 30, 111-116.

Karlsson HK, Nilsson PA, Nilsson J, Chibalin AV, Zierath JR & Blomstrand E. (2004). Branched-chain amino acids increase p70S6k phosphorylation in human skeletal muscle after resistance exercise. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 287, E1-7.

Kasper CE, White TP & Maxwell LC. (1990). Running during recovery from hindlimb suspension induces transient muscle injury. *J Appl Physiol* 68, 533-539.

Kasper CE. (1995). Sarcolemmal disruption in reloaded atrophic skeletal muscle. *J Appl Physiol* 79, 607-614.

Katsanos CS, Kobayashi H, Sheffield-Moore M, Aarsland A & Wolfe RR. (2005). Aging is associated with diminished accretion of muscle proteins after the ingestion of a small bolus of essential amino acids. *The American journal of clinical nutrition* 82, 1065-1073.

Katsanos CS, Kobayashi H, Sheffield-Moore M, Aarsland A & Wolfe RR. (2006). A high proportion of leucine is required for optimal stimulation of the rate of muscle protein synthesis by essential amino acids in the elderly. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 291, E381-387.

Kavazis AN, Talbert EE, Smuder AJ, Hudson MB, Nelson WB & Powers SK. (2009). Mechanical ventilation induces diaphragmatic mitochondrial dysfunction and increased oxidant production. *Free radical biology & medicine* 46, 842-850.

Kee AJ, Combaret L, Tilignac T, Souweine B, Aurousseau E, Dalle M, Taillandier D & Attaix D. (2003). Ubiquitin-proteasome-dependent muscle proteolysis responds slowly to insulin release and refeeding in starved rats. *The Journal of physiology* 546, 765-776.

Kehayias JJ, Fiatarone MA, Zhuang H & Roubenoff R. (1997). Total body potassium and body fat: relevance to aging. *The American journal of clinical nutrition* 66, 904-910.

Kelly FJ, Lewis SE, Anderson P & Goldspink DF. (1984). Pre- and postnatal growth and protein turnover in four muscles of the rat. *Muscle & nerve* 7, 235-242.

Kim JS, Kosek DJ, Petrella JK, Cross JM & Bamman MM. (2005). Resting and load-induced levels of myogenic gene transcripts differ between older adults with demonstrable sarcopenia and young men and women. *J Appl Physiol* 99, 2149-2158.

Kimball SR, Shantz LM, Horetsky RL & Jefferson LS. (1999). Leucine regulates translation of specific mRNAs in L6 myoblasts through mTOR-mediated changes in availability of eIF4E and phosphorylation of ribosomal protein S6. *The Journal of biological chemistry* 274, 11647-11652.

tel-00719700, version 1 - 20 Jul 2012

Kimball SR, Jefferson LS, Nguyen HV, Suryawan A, Bush JA & Davis TA. (2000). Feeding stimulates protein synthesis in muscle and liver of neonatal pigs through an mTOR-dependent process. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 279, E1080-1087.

Kimball SR & Jefferson LS. (2001). Regulation of protein synthesis by branched-chain amino acids. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care* 4, 39-43.

Kirschke H, Wood L, Roisen FJ & Bird JW. (1983). Activity of lysosomal cysteine proteinase during differentiation of rat skeletal muscle. *The Biochemical journal* 214, 871-877.

Kitson J, Raven T, Jiang YP, Goeddel DV, Giles KM, Pun KT, Grinham CJ, Brown R & Farrow SN. (1996). A death-domain-containing receptor that mediates apoptosis. *Nature* 384, 372-375.

Kobayashi H, Borsheim E, Anthony TG, Traber DL, Badalamenti J, Kimball SR, Jefferson LS & Wolfe RR. (2003). Reduced amino acid availability inhibits muscle protein synthesis and decreases activity of initiation factor eIF2B. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 284, E488-498.

Kobayashi H, Kato H, Hirabayashi Y, Murakami H & Suzuki H. (2006). Modulations of muscle protein metabolism by branched-chain amino acids in normal and muscle-atrophying rats. *The Journal of nutrition* 136, 234S-236S.

Koesterer TJ, Dodd SL & Powers S. (2002). Increased antioxidant capacity does not attenuate muscle atrophy caused by unweighting. *J Appl Physiol* 93, 1959-1965.

Komamura K, Shirotani-Ikejima H, Tatsumi R, Tsujita-Kuroda Y, Kitakaze M, Miyatake K, Sunagawa K & Miyata T. (2003). Differential gene expression in the rat skeletal and heart muscle in glucocorticoid-induced myopathy: analysis by microarray. *Cardiovascular drugs and therapy / sponsored by the International Society of Cardiovascular Pharmacotherapy* 17, 303-310.

Kondo H, Miura M & Itokawa Y. (1991). Oxidative stress in skeletal muscle atrophied by immobilization. *Acta Physiol Scand* 142, 527-528.

Kondo H, Kodama J, Kishibe T & Itokawa Y. (1993). Oxidative stress during recovery from muscle atrophy. *FEBS letters* 326, 189-191.

Koopman R, Wagenmakers AJ, Manders RJ, Zorenc AH, Senden JM, Gorselink M, Keizer HA & van Loon LJ. (2005). Combined ingestion of protein and free leucine with carbohydrate increases postexercise muscle protein synthesis in vivo in male subjects. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 288, E645-653.

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.

Kosek DJ, Kim JS, Petrella JK, Cross JM & Bamman MM. (2006). Efficacy of 3 days/wk resistance training on myofiber hypertrophy and myogenic mechanisms in young vs. older adults. *J Appl Physiol* 101, 531-544.

Krawiec BJ, Frost RA, Vary TC, Jefferson LS & Lang CH. (2005). Hindlimb casting decreases muscle mass in part by proteasome-dependent proteolysis but independent of protein synthesis. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 289, E969-980.

Kubo K, Kanehisa H, Azuma K, Ishizu M, Kuno SY, Okada M & Fukunaga T. (2003). Muscle architectural characteristics in women aged 20-79 years. *Medicine and science in sports and exercise* 35, 39-44.

Kuh D, Hardy R, Butterworth S, Okell L, Wadsworth M, Cooper C & Aihie Sayer A. (2006). Developmental origins of midlife grip strength: findings from a birth cohort study. *The journals of gerontology* 61, 702-706.

tel-00719700, version 1 - 20 Jul 2012

Kujawa M, Baran W & Jankowska-Steifer E. (2005). Quantitative ultrastructural changes in satellite cells of rats immobilized after soleus muscle denervation. *Experimental and molecular pathology* 78, 78-85.

Kwiatkowski DJ & Manning BD. (2005). Tuberous sclerosis: a GAP at the crossroads of multiple signaling pathways. *Human molecular genetics* 14 Spec No. 2, R251-258.

Lacroix M, Bos C, Leonil J, Airinei G, Luengo C, Dare S, Benamouzig R, Fouillet H, Fauquant J, Tome D & Gaudichon C. (2006). Compared with casein or total milk protein, digestion of milk soluble proteins is too rapid to sustain the anabolic postprandial amino acid requirement. *The American journal of clinical nutrition* 84**,** 1070-1079.ang CH, Frost RA, Nairn AC, MacLean DA & Vary TC. (2002). TNF-alpha impairs heart and skeletal muscle protein synthesis by altering translation initiation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 282, E336-347.

Lang T, Streeper T, Cawthon P, Baldwin K, Taaffe DR & Harris TB. (2010). Sarcopenia: etiology, clinical consequences, intervention, and assessment. *Osteoporos Int* 21, 543-559.

Langley B, Thomas M, Bishop A, Sharma M, Gilmour S & Kambadur R. (2002). Myostatin inhibits myoblast differentiation by down-regulating MyoD expression. *The Journal of biological chemistry* 277, 49831-49840.

Larsson L. (1978). Morphological and functional characteristics of the ageing skeletal muscle in man. A cross-sectional study. *Acta physiologica Scandinavica* 457, 1-36.

Latres E, Amini AR, Amini AA, Griffiths J, Martin FJ, Wei Y, Lin HC, Yancopoulos GD & Glass DJ. (2005). Insulin-like growth factor-1 (IGF-1) inversely regulates atrophy-induced genes via the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/mammalian target of rapamycin (PI3K/Akt/mTOR) pathway. *The Journal of biological chemistry* 280, 2737-2744.

Lawler JM, Song W & Demaree SR. (2003). Hindlimb unloading increases oxidative stress and disrupts antioxidant capacity in skeletal muscle. *Free radical biology & medicine* 35, 9-16.

Lees SJ, Rathbone CR & Booth FW. (2006). Age-associated decrease in muscle precursor cell differentiation. *American journal of physiology* 290, C609-615.

Leeuwenburgh C, Gurley CM, Strotman BA & Dupont-Versteegden EE. (2005). Age-related differences in apoptosis with disuse atrophy in soleus muscle. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 288, R1288-1296.

Levine RL, Mosoni L, Berlett BS & Stadtman ER. (1996). Methionine residues as endogenous antioxidants in proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 15036-15040.

Lexell J, Henriksson-Larsen K, Winblad B & Sjostrom M. (1983). Distribution of different fiber types in human skeletal muscles: effects of aging studied in whole muscle cross sections. *Muscle & nerve* 6, 588-595.

Lexell J, Taylor CC & Sjostrom M. (1988). What is the cause of the ageing atrophy? Total number, size and proportion of different fiber types studied in whole vastus lateralis muscle from 15- to 83-year-old men. *Journal of the neurological sciences* 84, 275-294.

Lexell J. (1995). Human aging, muscle mass, and fiber type composition. *The journals of gerontology* 50 Spec No, 11-16.

Li JB & Jefferson LS. (1978). Influence of amino acid availability on protein turnover in perfused skeletal muscle. *Biochimica et biophysica acta* 544, 351-359.

Li YP, Schwartz RJ, Waddell ID, Holloway BR & Reid MB. (1998). Skeletal muscle myocytes undergo protein loss and reactive oxygen-mediated NF-kappaB activation in response to tumor necrosis factor alpha. *Faseb J* 12, 871-880.

tel-00719700, version 1 - 20 Jul 2012

Li LY, Luo X & Wang X. (2001). Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature* 412, 95-99.

Li YP, Lecker SH, Chen Y, Waddell ID, Goldberg AL & Reid MB. (2003a). TNF-alpha increases ubiquitin-conjugating activity in skeletal muscle by up-regulating UbcH2/E220k. *Faseb J* 17, 1048-1057.

Li YP, Chen Y, Li AS & Reid MB. (2003a). Hydrogen peroxide stimulates ubiquitin-conjugating activity and expression of genes for specific E2 and E3 proteins in skeletal muscle myotubes. *American journal of physiology* 285, C806-812.

Li Y, Gazdoiu S, Pan ZQ & Fuchs SY. (2004). Stability of homologue of Slimb F-box protein is regulated by availability of its substrate. *The Journal of biological chemistry* 279, 11074-11080.

Li YP, Chen Y, John J, Moylan J, Jin B, Mann DL & Reid MB. (2005). TNF-alpha acts via p38 MAPK to stimulate expression of the ubiquitin ligase atrogin1/MAFbx in skeletal muscle. *Faseb J* 19, 362-370.

Lindle RS, Metter EJ, Lynch NA, Fleg JL, Fozard JL, Tobin J, Roy TA & Hurley BF. (1997). Age and gender comparisons of muscle strength in 654 women and men aged 20-93 yr. *J Appl Physiol* 83, 1581-1587.

Liston P, Fong WG & Korneluk RG. (2003). The inhibitors of apoptosis: there is more to life than Bcl2. *Oncogene* 22, 8568-8580.

Liu Z, Jahn LA, Long W, Fryburg DA, Wei L & Barrett EJ. (2001). Branched chain amino acids activate messenger ribonucleic acid translation regulatory proteins in human skeletal muscle, and glucocorticoids blunt this action. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 86, 2136-2143.

Liu Z, Jahn LA, Wei L, Long W & Barrett EJ. (2002). Amino acids stimulate translation initiation and protein synthesis through an Akt-independent pathway in human skeletal muscle. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 87, 5553-5558.

Llovera M, Garcia-Martinez C, Agell N, Lopez-Soriano FJ & Argiles JM. (1997). TNF can directly induce the expression of ubiquitin-dependent proteolytic system in rat soleus muscles. *Biochemical and biophysical research communications* 230, 238-241.

Louard RJ, Barrett EJ & Gelfand RA. (1990). Effect of infused branched-chain amino acids on muscle and whole-body amino acid metabolism in man. *Clin Sci (Lond)* 79, 457-466.

Louard RJ, Barrett EJ & Gelfand RA. (1995). Overnight branched-chain amino acid infusion causes sustained suppression of muscle proteolysis. *Metabolism: clinical and experimental* 44**,** 424-429.

Loughna P, Goldspink G & Goldspink DF. (1986). Effect of inactivity and passive stretch on protein turnover in phasic and postural rat muscles. *J Appl Physiol* 61, 173-179.

Loughna PT, Izumo S, Goldspink G & Nadal-Ginard B. (1990). Disuse and passive stretch cause rapid alterations in expression of developmental and adult contractile protein genes in skeletal muscle. *Development (Cambridge, England)* 109, 217-223.

Lovejoy JC, Smith SR, Zachwieja JJ, Bray GA, Windhauser MM, Wickersham PJ, Veldhuis JD, Tulley R & de la Bretonne JA. (1999). Low-dose T(3) improves the bed rest model of simulated weightlessness in men and women. *The American journal of physiology* 277, E370-379.

Lynch CJ. (2001). Role of leucine in the regulation of mTOR by amino acids: revelations from structure-activity studies. *The Journal of nutrition* 131, 861S-865S.

tel-00719700, version 1 - 20 Jul 2012

Lynch CJ, Hutson SM, Patson BJ, Vaval A & Vary TC. (2002). Tissue-specific effects of chronic dietary leucine and norleucine supplementation on protein synthesis in rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 283, E824-835.

Lynch CJ, Halle B, Fujii H, Vary TC, Wallin R, Damuni Z & Hutson SM. (2003). Potential role of leucine metabolism in the leucine-signaling pathway involving mTOR. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 285, E854-863.

MacFarlane M, Ahmad M, Srinivasula SM, Fernandes-Alnemri T, Cohen GM & Alnemri ES. (1997). Identification and molecular cloning of two novel receptors for the cytotoxic ligand TRAIL. *The Journal of biological chemistry* 272, 25417-25420.

Magne H, Savary-Auzeloux I, Vazeille E, Claustre A, Attaix D, Anne L, Santé-Lhoutellier V, Gatelier P G, Dardevet D & Combaret L. (2011). Lack of muscle recovery after immobilization in old rats does not result from a defect in normalization of the ubiquitin-proteasome and the caspase-dependent apoptotic pathways. *The Journal of physiology* 589, 511-524.

Malmgren LT, Jones CE & Bookman LM. (2001). Muscle fiber and satellite cell apoptosis in the aging human thyroarytenoid muscle: a stereological study with confocal laser scanning microscopy. *Otolaryngol Head Neck Surg* 125, 34-39.

Mammucari C, Milan G, Romanello V, Masiero E, Rudolf R, Del Piccolo P, Burden SJ, Di Lisi R, Sandri C, Zhao J, Goldberg AL, Schiaffino S & Sandri M. (2007). FoxO3 controls autophagy in skeletal muscle in vivo. *Cell metabolism* 6, 458-471.

Manning BD, Tee AR, Logsdon MN, Blenis J & Cantley LC. (2002). Identification of the tuberous sclerosis complex-2 tumor suppressor gene product tuberin as a target of the phosphoinositide 3-kinase/akt pathway. *Molecular cell* 10, 151-162.

Marsters SA, Sheridan JP, Pitti RM, Brush J, Goddard A & Ashkenazi A. (1998). Identification of a ligand for the death-domain-containing receptor Apo3. *Curr Biol* 8, 525-528.

Martin I & Grotewiel MS. (2006). Oxidative damage and age-related functional declines. *Mechanisms of ageing and development* 127, 411-423.

Martinou JC & Green DR. (2001). Breaking the mitochondrial barrier. *Nature reviews* 2, 63-67.

Marzani B, Balage M, Venien A, Astruc T, Papet I, Dardevet D & Mosoni L. (2008). Antioxidant supplementation restores defective leucine stimulation of protein synthesis in skeletal muscle from old rats. *The Journal of nutrition* 138, 2205-2211.

Marzetti E & Leeuwenburgh C. (2006). Skeletal muscle apoptosis, sarcopenia and frailty at old age. *Experimental gerontology* 41, 1234-1238.

Marzetti E, Groban L, Wohlgemuth SE, Lees HA, Lin M, Jobe H, Giovannini S, Leeuwenburgh C & Carter CS. (2008a). Effects of short-term GH supplementation and treadmill exercise training on physical performance and skeletal muscle apoptosis in old rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 294, R558-567.

Marzetti E, Wohlgemuth SE, Lees HA, Chung HY, Giovannini S & Leeuwenburgh C. (2008b). Age-related activation of mitochondrial caspase-independent apoptotic signaling in rat gastrocnemius muscle. *Mechanisms of ageing and development* 129, 542-549.

Marzetti E, Carter CS, Wohlgemuth SE, Lees HA, Giovannini S, Anderson B, Quinn LS & Leeuwenburgh C. (2009). Changes in IL-15 expression and death-receptor apoptotic signaling in rat gastrocnemius muscle with aging and life-long calorie restriction. *Mechanisms of ageing and development* 130, 272-280.

tel-00719700, version 1 - 20 Jul 2012

Marzetti E, Privitera G, Simili V, Wohlgemuth SE, Aulisa L, Pahor M & Leeuwenburgh C. (2010a). Multiple pathways to the same end: mechanisms of myonuclear apoptosis in sarcopenia of aging. *TheScientificWorldJournal* 10, 340-349.

Marzetti E, Hwang JC, Lees HA, Wohlgemuth SE, Dupont-Versteegden EE, Carter CS, Bernabei R & Leeuwenburgh C. (2010b). Mitochondrial death effectors: relevance to sarcopenia and disuse muscle atrophy. *Biochimica et biophysica acta* 1800, 235-244.

Matuszczak Y, Arbogast S & Reid MB. (2004). Allopurinol mitigates muscle contractile dysfunction caused by hindlimb unloading in mice. *Aviation, space, and environmental medicine* 75, 581-588.

May ME & Buse MG. (1989). Effects of branched-chain amino acids on protein turnover. *Diabetes/metabolism reviews* 5, 227-245.

Mayot G, Vidal K, Combaret L, Breuille D, Blum S, Obled C & Papet I. (2007). Presence of low-grade inflammation in old rats does not worsen skeletal muscle loss under an endotoxemic and dietary stress. *Experimental gerontology* 42, 1167-1175.

Mays PK, McAnulty RJ & Laurent GJ. (1991). Age-related changes in rates of protein synthesis and degradation in rat tissues. *Mechanisms of ageing and development* 59, 229-241.

McArdle A, Vasilaki A & Jackson M. (2002). Exercise and skeletal muscle ageing: cellular and molecular mechanisms. *Ageing research reviews* 1, 79-93.

McClung JM, Davis JM & Carson JA. (2007). Ovarian hormone status and skeletal muscle inflammation during recovery from disuse in rats. *Experimental physiology* 92, 219-232.

McKinnell IW & Rudnicki MA. (2004). Molecular mechanisms of muscle atrophy. *Cell* 119, 907-910. Llovera M, Garcia-Martinez C, Agell N, Lopez-Soriano FJ & Argiles JM. (1997). TNF can directly induce the expression of ubiquitin-dependent proteolytic system in rat soleus muscles. *Biochemical and biophysical research communications* 230, 238-241.

Medina R, Wing SS & Goldberg AL. (1995). Increase in levels of polyubiquitin and proteasome mRNA in skeletal muscle during starvation and denervation atrophy. *The Biochemical journal* 307 (Pt 3), 631-637.

Mihara M & Uchiyama M. (1978). Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Analytical biochemistry* 86, 271-278.

Minnaard R, Wagenmakers AJ, Combaret L, Attaix D, Drost MR, van Kranenburg GP, Schaart G & Hesselink MK. (2005). Ubiquitin-proteasome-dependent proteolytic activity remains elevated after zymosan-induced sepsis in rats while muscle mass recovers. *The international journal of biochemistry & cell biology* 37, 2217-2225.

Mitch WE & Goldberg AL. (1996). Mechanisms of muscle wasting. The role of the ubiquitin-proteasome pathway. *The New England journal of medicine* 335, 1897-1905.

Mitchell PO & Pavlath GK. (2001). A muscle precursor cell-dependent pathway contributes to muscle growth after atrophy. *American journal of physiology* 281, C1706-1715.

Mitchell JC, Evenson AR & Tawa NE, Jr. (2004). Leucine inhibits proteolysis by the mTOR kinase signaling pathway in skeletal muscle. *J Surg Res* 121, 311.

Mittendorfer B, Andersen JL, Plomgaard P, Saltin B, Babraj JA, Smith K & Rennie MJ. (2005). Protein synthesis rates in human muscles: neither anatomical location nor fibre-type composition are major determinants. *The Journal of physiology* 563, 203-211.

Miyashita T & Reed JC. (1995). Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell* 80, 293-299.

Morey-Holton ER & Globus RK. (2002). Hindlimb unloading rodent model: technical aspects. *J Appl Physiol* 92, 1367-1377.

tel-00719700, version 1 - 20 Jul 2012

Morishima N, Nakanishi K, Takenouchi H, Shibata T & Yasuhiko Y. (2002). An endoplasmic reticulum stress-specific caspase cascade in apoptosis. Cytochrome c-independent activation of caspase-9 by caspase-12. *The Journal of biological chemistry* 277, 34287-34294.

Morley JE, Haren MT, Rolland Y & Kim MJ. (2006). Frailty. *The Medical clinics of North America* 90, 837-847.

Morris RT, Spangenburg EE & Booth FW. (2004). Responsiveness of cell signaling pathways during the failed 15-day regrowth of aged skeletal muscle. *J Appl Physiol* 96, 398-404.

Morris CA, Morris LD, Kennedy AR & Sweeney HL. (2005). Attenuation of skeletal muscle atrophy via protease inhibition. *J Appl Physiol* 99, 1719-1727.

Mortimore G, Kadowaki M & Heydrick S. (1992). The autophagic pathway in liver: its regulation and role in macromolecular turnover, in KS Nair (ed), Protein Metabolism in Diabetes Mellitus. *Smith Gordon, London*, 125-138.

Mosoni L, Houlier ML, Mirand PP, Bayle G & Grizard J. (1993). Effect of amino acids alone or with insulin on muscle and liver protein synthesis in adult and old rats. *The American journal of physiology* 264, E614-620.

Mosoni L, Valluy MC, Serrurier B, Prugnaud J, Obled C, Guezennec CY & Mirand PP. (1995). Altered response of protein synthesis to nutritional state and endurance training in old rats. *The American journal of physiology* 268, E328-335.

Mosoni L, Malmezat T, Valluy MC, Houlier ML, Attaix D & Mirand PP. (1999). Lower recovery of muscle protein lost during starvation in old rats despite a stimulation of protein synthesis. *The American journal of physiology* 277, E608-616.

Moss FP & Leblond CP. (1971). Satellite cells as the source of nuclei in muscles of growing rats. *The Anatomical record* 170, 421-435.

Moylan JS & Reid MB. (2007). Oxidative stress, chronic disease, and muscle wasting. *Muscle & nerve* 35, 411-429.

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. *Journal of natural products*, Koesterer et coll, 2002.

Muller FL, Song W, Jang YC, Liu Y, Sabia M, Richardson A & Van Remmen H. (2007). Denervation-induced skeletal muscle atrophy is associated with increased mitochondrial ROS production. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 293, R1159-1168.

Munafo DB & Colombo MI. (2001). A novel assay to study autophagy: regulation of autophagosome vacuole size by amino acid deprivation. *Journal of cell science* 114**,** 3619-3629.

Munoz KA, Satarug S & Tischler ME. (1993). Time course of the response of myofibrillar and sarcoplasmic protein metabolism to unweighting of the soleus muscle. *Metabolism: clinical and experimental* 42, 1006-1012.

Nair KS, Schwartz RG & Welle S. (1992). Leucine as a regulator of whole body and skeletal muscle protein metabolism in humans. *The American journal of physiology* 263, E928-934.

Nair KS. (1995). Muscle protein turnover: methodological issues and the effect of aging. *The journals of gerontology* 50 Spec No, 107-112.

Nair KS. (2005). Aging muscle. *The American journal of clinical nutrition* 81, 953-963.

tel-00719700, version 1 - 20 Jul 2012

Nakashima K, Ishida A, Yamazaki M & Abe H. (2005). Leucine suppresses myofibrillar proteolysis by down-regulating ubiquitin-proteasome pathway in chick skeletal muscles. *Biochemical and biophysical research communications* 336, 660-666.

Narici MV, Kayser B, Barattini P & Cerretelli P. (1997). Changes in electrically evoked skeletal muscle contractions during 17-day spaceflight and bed rest. *International journal of sports medicine* 18 Suppl 4, S290-292.

Nave BT, Ouwens M, Withers DJ, Alessi DR & Shepherd PR. (1999). Mammalian target of rapamycin is a direct target for protein kinase B: identification of a convergence point for opposing effects of insulin and amino-acid deficiency on protein translation. *The Biochemical journal* 344 Pt 2, 427-431.

Nguyen HX & Tidball JG. (2003a). 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* 550, 347-356.

Nguyen HX & Tidball JG. (2003b). Null mutation of gp91phox reduces muscle membrane lysis during muscle inflammation in mice. *The Journal of physiology* 553, 833-841.

Nicks DK, Beneke WM, Key RM & Timson BF. (1989). Muscle fibre size and number following immobilisation atrophy. *Journal of anatomy* 163, 1-5.

Nikawa T, Ishidoh K, Hirasaka K, Ishihara I, Ikemoto M, Kano M, Kominami E, Nonaka I, Ogawa T, Adams GR, Baldwin KM, Yasui N, Kishi K & Takeda S. (2004). Skeletal muscle gene expression in space-flown rats. *Faseb J* 18, 522-524.

Oishi Y, Ogata T, Yamamoto KI, Terada M, Ohira T, Ohira Y, Taniguchi K & Roy RR. (2008). Cellular adaptations in soleus muscle during recovery after hindlimb unloading. *Acta physiologica (Oxford, England)* 192, 381-395.

O'Keefe MP, Perez FR, Sloniger JA, Tischler ME & Henriksen EJ. (2004). Enhanced insulin action on glucose transport and insulin signaling in 7-day unweighted rat soleus muscle. *J Appl Physiol* 97, 63-71.

O'Leary MF & Hood DA. (2008). Effect of prior chronic contractile activity on mitochondrial function and apoptotic protein expression in denervated muscle. *J Appl Physiol* 105, 114-120.

O'Leary MF & Hood DA. (2009). Denervation-induced oxidative stress and autophagy signaling in muscle. *Autophagy* **5,** 230-231.

Orlowski M, Cardozo C & Michaud C. (1993). Evidence for the presence of five distinct proteolytic components in the pituitary multicatalytic proteinase complex. Properties of two components

cleaving bonds on the carboxyl side of branched chain and small neutral amino acids. *Biochemistry* 32, 1563-1572.

Ota N, Soga S, Haramizu S, Yokoi Y, Hase T & Murase T. (2011). Tea catechins prevent contractile dysfunction in unloaded murine soleus muscle: A pilot study. *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif* 27, 955-959.

Paddon-Jones D, Sheffield-Moore M, Zhang XJ, Volpi E, Wolf SE, Aarsland A, Ferrando AA & Wolfe RR. (2004). Amino acid ingestion improves muscle protein synthesis in the young and elderly. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 286, E321-328.

tel-00719700, version 1 - 20 Jul 2012

Paddon-Jones D, Sheffield-Moore M, Katsanos CS, Zhang XJ & Wolfe RR. (2006). Differential stimulation of muscle protein synthesis in elderly humans following isocaloric ingestion of amino acids or whey protein. *Experimental gerontology* 41, 215-219.

Pain VM. (1996). Initiation of protein synthesis in eukaryotic cells. *European journal of biochemistry / FEBS* 236, 747-771.

Pan G, O'Rourke K, Chinnaiyan AM, Gentz R, Ebner R, Ni J & Dixit VM. (1997). The receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *Science (New York, NY* 276, 111-113.

Pansarasa O, Flati V, Corsetti G, Brocca L, Pasini E & D'Antona G. (2008). Oral amino acid supplementation counteracts age-induced sarcopenia in elderly rats. *The American journal of cardiology* 101, 35E-41E.

Park H, Park S, Shephard RJ & Aoyagi Y. (2010). Yearlong physical activity and sarcopenia in older adults: the Nakanojo Study. *European journal of applied physiology* 109, 953-961.

Pattison JS, Folk LC, Madsen RW & Booth FW. (2003a). Selected Contribution: Identification of differentially expressed genes between young and old rat soleus muscle during recovery from immobilization-induced atrophy. *J Appl Physiol* 95, 2171-2179.

Pattison JS, Folk LC, Madsen RW, Childs TE & Booth FW. (2003b). Transcriptional profiling identifies extensive downregulation of extracellular matrix gene expression in sarcopenic rat soleus muscle. *Physiological genomics* 15, 34-43.

Patterson MF, Stephenson GM & Stephenson DG. (2006). Denervation produces different single fiber phenotypes in fast- and slow-twitch hindlimb muscles of the rat. *American journal of physiology* 291, C518-528.

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). *European journal of applied physiology* 101, 143-194.

Pennings B, Boirie Y, Senden JM, Gijsen AP, Kuipers H & van Loon LJ. (2011). Whey protein stimulates postprandial muscle protein accretion more effectively than do casein and casein hydrolysate in older men. *The American journal of clinical nutrition* 93, 997-1005.

Perrini S, Laviola L, Carreira MC, Cignarelli A, Natalicchio A & Giorgino F. (2010). The GH/IGF1 axis and signaling pathways in the muscle and bone: mechanisms underlying age-related skeletal muscle wasting and osteoporosis. *The Journal of endocrinology* 205, 201-210.

Phillips T & Leeuwenburgh C. (2005). Muscle fiber specific apoptosis and TNF-alpha signaling in sarcopenia are attenuated by life-long calorie restriction. *Faseb J* 19, 668-670.

Phillips SM, Glover EI & Rennie MJ. (2009). Alterations of protein turnover underlying disuse atrophy in human skeletal muscle. *J Appl Physiol* 107, 645-654.

Picard B, Jurie C, Cassar-Malek I & Hocquette J-F. (2003). Typologie et ontogenèse des fibres musculaires chez le bovin. *INRA Prod Anim* 16 125-131.

Pistilli EE, Jackson JR & Alway SE. (2006). Death receptor-associated pro-apoptotic signaling in aged skeletal muscle. *Apoptosis* 11, 2115-2126.

Pistilli EE, Siu PM & Alway SE. (2006b). Molecular regulation of apoptosis in fast plantaris muscles of aged rats. *The journals of gerontology* 61, 245-255.

Plant PJ, Bain JR, Correa JE, Woo M & Batt J. (2009). Absence of caspase-3 protects against denervation-induced skeletal muscle atrophy. *J Appl Physiol* 107, 224-234.

Polge C, Heng AE, Jarzaguet M, Ventadour S, Claustre A, Combaret L, Bechet D, Matondo M, Uttenweiler-Joseph S, Monsarrat B, Attaix D & Taillandier D. (2011). Muscle actin is polyubiquitinylated in vitro and in vivo and targeted for breakdown by the E3 ligase MuRF1. *Faseb J* Aug 2. [Epub ahead of print]

tel-00719700, version 1 - 20 Jul 2012

Powers SK, Kavazis AN & McClung JM. (2007). Oxidative stress and disuse muscle atrophy. *J Appl Physiol* 102, 2389-2397.

Powers SK & Jackson MJ. (2008). Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production. *Physiological reviews* 88, 1243-1276.

Primeau AJ, Adhihetty PJ & Hood DA. (2002). Apoptosis in heart and skeletal muscle. *Canadian journal of applied physiology = Revue canadienne de physiologie appliquee* 27, 349-395.

Proctor DN, Sinning WE, Walro JM, Sieck GC & Lemon PW. (1995). Oxidative capacity of human muscle fiber types: effects of age and training status. *J Appl Physiol* 78, 2033-2038.

Proud CG. (2004). Role of mTOR signalling in the control of translation initiation and elongation by nutrients. *Current topics in microbiology and immunology* 279, 215-244.

Proud CG. (2006). Regulation of protein synthesis by insulin. *Biochemical Society transactions* 34, 213-216.

Radak Z, Takahashi R, Kumiyama A, Nakamoto H, Ohno H, Ookawara T & Goto S. (2002). Effect of aging and late onset dietary restriction on antioxidant enzymes and proteasome activities, and protein carbonylation of rat skeletal muscle and tendon. *Experimental gerontology* 37, 1423-1430.

Rasmussen BB, Tipton KD, Miller SL, Wolf SE & Wolfe RR. (2000). An oral essential amino acid-carbohydrate supplement enhances muscle protein anabolism after resistance exercise. *J Appl Physiol* 88, 386-392.

Reid MB. (2005). Response of the ubiquitin-proteasome pathway to changes in muscle activity. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 288, R1423-1431.

Renault V, Thornell LE, Eriksson PO, Butler-Browne G & Mouly V. (2002). Regenerative potential of human skeletal muscle during aging. *Aging cell* 1, 132-139.

Rennie MJ, Wackerhage H, Spangenburg EE & Booth FW. (2004). Control of the size of the human muscle mass. *Annual review of physiology* 66, 799-828.

Rennie MJ, Selby A, Atherton P, Smith K, Kumar V, Glover EL & Philips SM. (2010). Facts, noise and wishful thinking: muscle protein turnover in aging and human disuse atrophy. *Scandinavian journal of medicine & science in sports* 20, 5-9.

Reynolds THt, Bodine SC & Lawrence JC, Jr. (2002). Control of Ser2448 phosphorylation in the mammalian target of rapamycin by insulin and skeletal muscle load. *The Journal of biological chemistry* 277, 17657-17662.

Reznick AZ & Packer L. (1994). Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. *Methods in enzymology* 233, 357-363.

Reznick AZ. (1995). Free radicals and muscle damage due to immobilization of old animals: effect of growth hormone. In: R.G. Cutler, L. Packer, J. Bertram and A. Mori, Editors, Oxidative stress and aging, Birkhauser Verlag, Basel. 171-178.

Rice KM & Blough ER. (2006). Sarcopenia-related apoptosis is regulated differently in fast- and slow-twitch muscles of the aging F344/N x BN rat model. *Mechanisms of ageing and development* 127, 670-679.

Rieu I, Sornet C, Bayle G, Prugnaud J, Pouyet C, Balage M, Papet I, Grizard J & Dardevet D. (2003). Leucine-supplemented meal feeding for ten days beneficially affects postprandial muscle protein synthesis in old rats. *The Journal of nutrition* 133, 1198-1205.

Rieu I, Balage M, Sornet C, Giraudet C, Pujos E, Grizard J, Mosoni L & Dardevet D. (2006). Leucine supplementation improves muscle protein synthesis in elderly men independently of hyperaminoacidaemia. *The Journal of physiology* 575, 305-315.

tel-00719700, version 1 - 20 Jul 2012

Rieu I, Balage M, Sornet C, Debras E, Ripes S, Rochon-Bonhomme C, Pouyet C, Grizard J & Dardevet D. (2007). Increased availability of leucine with leucine-rich whey proteins improves postprandial muscle protein synthesis in aging rats. *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif* 23, 323-331.

Rieu I, Magne H, Savary-Auzeloux I, Averous J, Bos C, Peyron MA, Combaret L & Dardevet D. (2009). Reduction of low grade inflammation restores blunting of postprandial muscle anabolism and limits sarcopenia in old rats. *The Journal of physiology* 587, 5483-5492.

Rooyackers OE, Adey DB, Ades PA & Nair KS. (1996). Effect of age on in vivo rates of mitochondrial protein synthesis in human skeletal muscle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 15364-15369.

Rosenberg IH. (1989). Summary Comments. *American Journal of Clinical Nutrition* 50, 1231-1233.

Roubenoff R & Hughes VA. (2000). Sarcopenia: current concepts. *The journals of gerontology* 55, M716-724.

Rousset S, Patureau Mirand P, Brandolini M, Martin JF & Boirie Y. (2003). Daily protein intakes and eating patterns in young and elderly French. *The British journal of nutrition* 90, 1107-1115.

Roux PP, Shahbazian D, Vu H, Holz MK, Cohen MS, Taunton J, Sonenberg N & Blenis J. (2007). RAS/ERK signaling promotes site-specific ribosomal protein S6 phosphorylation via RSK and stimulates cap-dependent translation. *The Journal of biological chemistry* 282, 14056-14064.

Sacheck JM, Hyatt JP, Raffaello A, Jagoe RT, Roy RR, Edgerton VR, Lecker SH & Goldberg AL. (2007). Rapid disuse and denervation atrophy involve transcriptional changes similar to those of muscle wasting during systemic diseases. *Faseb J* 21, 140-155.

Safdar A, Hamadeh MJ, Kaczor JJ, Raha S, Debeer J & Tarnopolsky MA. (2010). Aberrant mitochondrial homeostasis in the skeletal muscle of sedentary older adults. *PloS one* 5, e10778.

Saint Pierre BA & Tidball JG. (1994). Differential response of macrophage subpopulations to soleus muscle reloading after rat hindlimb suspension. *J Appl Physiol* 77, 290-297.

Sandri M, Sandri C, Gilbert A, Skurk C, Calabria E, Picard A, Walsh K, Schiaffino S, Lecker SH & Goldberg AL. (2004). Foxo transcription factors induce the atrophy-related ubiquitin ligase atrogin-1 and cause skeletal muscle atrophy. *Cell* 117, 399-412.

Sarbassov DD, Ali SM, Sengupta S, Sheen JH, Hsu PP, Bagley AF, Markhard AL & Sabatini DM. (2006). Prolonged rapamycin treatment inhibits mTORC2 assembly and Akt/PKB. *Molecular cell* 22, 159-168.

Sartorelli V & Fulco M. (2004). Molecular and cellular determinants of skeletal muscle atrophy and hypertrophy. *Sci STKE* 2004, re11.

Sayer AA, Syddall HE, Gilbody HJ, Dennison EM & Cooper C. (2004). Does sarcopenia originate in early life? Findings from the Hertfordshire cohort study. *The journals of gerontology* 59, M930-934.

Schaap LA, Pluijm SM, Deeg DJ & Visser M. (2006). Inflammatory markers and loss of muscle mass (sarcopenia) and strength. *The American journal of medicine* 119, 526 e529-517.

Schmalbruch H & Lewis DM. (2000). Dynamics of nuclei of muscle fibers and connective tissue cells in normal and denervated rat muscles. *Muscle & nerve* 23, 617-626.

tel-00719700, version 1 - 20 Jul 2012

Schultz E, Darr KC & Macius A. (1994). Acute effects of hindlimb unweighting on satellite cells of growing skeletal muscle. *J Appl Physiol* 76, 266-270.

Senf SM, Dodd SL & Judge AR. (2010). FOXO signaling is required for disuse muscle atrophy and is directly regulated by Hsp70. *American journal of physiology* 298, C38-45.

Servais S, Letexier D, Favier R, Duchamp C & Desplanches D. (2007). Prevention of unloading-induced atrophy by vitamin E supplementation: links between oxidative stress and soleus muscle proteolysis? *Free radical biology & medicine* 42, 627-635.

Shangraw RE, Stuart CA, Prince MJ, Peters EJ & Wolfe RR. (1988). Insulin responsiveness of protein metabolism in vivo following bedrest in humans. *The American journal of physiology* 255, E548-558.

Shao H, Chou J, Baty CJ, Burke NA, Watkins SC, Stolz DB & Wells A. (2006). Spatial localization of m-calpain to the plasma membrane by phosphoinositide biphosphate binding during epidermal growth factor receptor-mediated activation. *Molecular and cellular biology* 26**,** 5481-5496.

Short KR, Vittone JL, Bigelow ML, Proctor DN, Coenen-Schimke JM, Rys P & Nair KS. (2005). Changes in myosin heavy chain mRNA and protein expression in human skeletal muscle with age and endurance exercise training. *J Appl Physiol* 99, 95-102.

Sies H. (1997). Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Experimental physiology* 82, 291-295.

Sitnick M, Foley AM, Brown M & Spangenburg EE. (2006). Ovariectomy prevents the recovery of atrophied gastrocnemius skeletal muscle mass. *J Appl Physiol* 100, 286-293.

Siu PM, Pistilli EE & Alway SE. (2005). Apoptotic responses to hindlimb suspension in gastrocnemius muscles from young adult and aged rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 289, R1015-1026.

Siu PM & Alway SE. (2006). Deficiency of the Bax gene attenuates denervation-induced apoptosis. *Apoptosis* 11, 967-981.

Siu PM, Pistilli EE & Alway SE. (2008). Age-dependent increase in oxidative stress in gastrocnemius muscle with unloading. *J Appl Physiol* 105, 1695-1705.

Smith K, Barua JM, Watt PW, Scrimgeour CM & Rennie MJ. (1992). Flooding with L-[1-13C]leucine stimulates human muscle protein incorporation of continuously infused L-[1-13C]valine. *The American journal of physiology* 262, E372-376.

Smith HK, Maxwell L, Martyn JA & Bass JJ. (2000). Nuclear DNA fragmentation and morphological alterations in adult rabbit skeletal muscle after short-term immobilization. *Cell and tissue research* 302, 235-241.

Smith IJ & Dodd SL. (2007). Calpain activation causes a proteasome-dependent increase in protein degradation and inhibits the Akt signalling pathway in rat diaphragm muscle. *Experimental physiology* 92, 561-573.

Smuder AJ, Kavazis AN, Hudson MB, Nelson WB & Powers SK. (2010). Oxidation enhances myofibrillar protein degradation via calpain and caspase-3. *Free radical biology & medicine* 49, 1152-1160.

Solomon V & Goldberg AL. (1996). Importance of the ATP-ubiquitin-proteasome pathway in the degradation of soluble and myofibrillar proteins in rabbit muscle extracts. *The Journal of biological chemistry* 271, 26690-26697.

Solomon V, Lecker SH & Goldberg AL. (1998). The N-end rule pathway catalyzes a major fraction of the protein degradation in skeletal muscle. *The Journal of biological chemistry* 273, 25216-25222.

tel-00719700, version 1 - 20 Jul 2012

St-Amand J, Okamura K, Matsumoto K, Shimizu S & Sogawa Y. (2001). Characterization of control and immobilized skeletal muscle: an overview from genetic engineering. *Faseb J* 15, 684-692.

Stein TP, Schluter MD, Leskiw MJ & Boden G. (1999). Attenuation of the protein wasting associated with bed rest by branched-chain amino acids. *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif* 15, 656-660.

Stein T, Schluter M, Galante A, Soteropoulos P, Tolias P, Grindeland R, Moran M, Wang T, Polansky M & Wade C. (2002). Energy metabolism pathways in rat muscle under conditions of simulated microgravity. *The Journal of nutritional biochemistry* 13, 471.

Stevenson EJ, Giresi PG, Koncarevic A & Kandarian SC. (2003). Global analysis of gene expression patterns during disuse atrophy in rat skeletal muscle. *The Journal of physiology* 551, 33-48.

Stewart CE, Newcomb PV & Holly JM. (2004). Multifaceted roles of TNF-alpha in myoblast destruction: a multitude of signal transduction pathways. *Journal of cellular physiology* 198, 237-247.

Stitt TN, Drujan D, Clarke BA, Panaro F, Timofeyva Y, Kline WO, Gonzalez M, Yancopoulos GD & Glass DJ. (2004). The IGF-1/PI3K/Akt pathway prevents expression of muscle atrophy-induced ubiquitin ligases by inhibiting FOXO transcription factors. *Molecular cell* 14, 395-403.

Storz P. (2006). Reactive oxygen species-mediated mitochondria-to-nucleus signaling: a key to aging and radical-caused diseases. *Sci STKE* 2006, re3.

Strasser H, Tiefenthaler M, Steinlechner M, Eder I, Bartsch G & Konwalinka G. (2000). Age dependent apoptosis and loss of rhabdosphincter cells. *The Journal of urology* 164, 1781-1785.

Strle K, Broussard SR, McCusker RH, Shen WH, Johnson RW, Freund GG, Dantzer R & Kelley KW. (2004). Proinflammatory cytokine impairment of insulin-like growth factor I-induced protein synthesis in skeletal muscle myoblasts requires ceramide. *Endocrinology* 145, 4592-4602.

Stuart CA, Shangraw RE, Peters EJ & Wolfe RR. (1990). Effect of dietary protein on bed-rest-related changes in whole-body-protein synthesis. *The American journal of clinical nutrition* 52, 509-514.

Suetta C, Hvid LG, Justesen L, Christensen U, Neergaard K, Simonsen L, Ortenblad N, Magnusson SP, Kjaer M & Aagaard P. (2009). Effects of aging on human skeletal muscle after immobilization and retraining. *J Appl Physiol* 107, 1172-1180.

Sugiura T, Abe N, Nagano M, Goto K, Sakuma K, Naito H, Yoshioka T & Powers SK. (2005). Changes in PKB/Akt and calcineurin signaling during recovery in atrophied soleus muscle induced by unloading. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 288, R1273-1278.

Symons TB, Sheffield-Moore M, Wolfe RR & Paddon-Jones D. (2009). A moderate serving of high-quality protein maximally stimulates skeletal muscle protein synthesis in young and elderly subjects. *Journal of the American Dietetic Association* 109, 1582-1586.

Szulc P, Duboeuf F, Marchand F & Delmas PD. (2004). Hormonal and lifestyle determinants of appendicular skeletal muscle mass in men: the MINOS study. *The American journal of clinical nutrition* 80, 496-503.

Tada O & Yokogoshi H. (2002). Effect of different dietary protein composition on skeletal muscle atrophy by suspension hypokinesia/hypodynamia in rats. *Journal of nutritional science and vitaminology* 48, 115-119.

tel-00719700, version 1 - 20 Jul 2012

Taillandier D, Bigard X, Desplanches D, Attaix D, Guezennec CY & Arnal M. (1993). Role of protein intake on protein synthesis and fiber distribution in the unweighted soleus muscle. *J Appl Physiol* 75, 1226-1232.

Taillandier D, Aurousseau E, Meynial-Denis D, Bechet D, Ferrara M, Cottin P, Ducastaing A, Bigard X, Guezennec CY, Schmid HP & et al. (1996). Coordinate activation of lysosomal, Ca 2+-activated and ATP-ubiquitin-dependent proteinases in the unweighted rat soleus muscle. *The Biochemical journal* 316 (Pt 1), 65-72.

Taillandier D, Aurousseau E, Combaret L, Guezennec CY & Attaix D. (2003). Regulation of proteolysis during reloading of the unweighted soleus muscle. *The international journal of biochemistry & cell biology* 35, 665-675.

Tartaglia LA, Rothe M, Hu YF & Goeddel DV. (1993). Tumor necrosis factor's cytotoxic activity is signaled by the p55 TNF receptor. *Cell* 73, 213-216.

Tenover JL. (1997). Testosterone and the aging male. *Journal of andrology* 18, 103-106.

Terman A & Brunk UT. (2004). Aging as a catabolic malfunction. *The international journal of biochemistry & cell biology* 36, 2365-2375.

Tesch PA, von Walden F, Gustafsson T, Linnehan RM & Trappe TA. (2008). Skeletal muscle proteolysis in response to short-term unloading in humans. *J Appl Physiol* 105, 902-906.

Tessari P, Inchiostro S, Biolo G, Trevisan R, Fantin G, Marescotti MC, Iori E, Tiengo A & Crepaldi G. (1987). Differential effects of hyperinsulinemia and hyperaminoacidemia on leucine-carbon metabolism in vivo. Evidence for distinct mechanisms in regulation of net amino acid deposition. *The Journal of clinical investigation* 79, 1062-1069.

Thomason DB, Biggs RB & Booth FW. (1989). Protein metabolism and beta-myosin heavy-chain mRNA in unweighted soleus muscle. *The American journal of physiology* 257, R300-305.

Thomason DB & Booth FW. (1990). Atrophy of the soleus muscle by hindlimb unweighting. *J Appl Physiol* 68, 1-12.

Thornberry NA & Lazebnik Y. (1998). Caspases: enemies within. *Science (New York, NY* 281, 1312-1316.

Thrower JS, Hoffman L, Rechsteiner M & Pickart CM. (2000). Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal. *The EMBO journal* 19, 94-102.

Tiao G, Fagan JM, Samuels N, James JH, Hudson K, Lieberman M, Fischer JE & Hasselgren PO. (1994). Sepsis stimulates nonlysosomal, energy-dependent proteolysis and increases ubiquitin mRNA levels in rat skeletal muscle. *The Journal of clinical investigation* 94, 2255-2264.

Tilignac T, Temparis S, Combaret L, Taillandier D, Pouch MN, Cervek M, Cardenas DM, Le Bricon T, Debiton E, Samuels SE, Madelmont JC & Attaix D. (2002). Chemotherapy inhibits skeletal muscle ubiquitin-proteasome-dependent proteolysis. *Cancer research* 62, 2771-2777.

Tintignac LA, Lagirand J, Batonnet S, Sirri V, Leibovitch MP & Leibovitch SA. (2005). Degradation of MyoD mediated by the SCF (MAFbx) ubiquitin ligase. *The Journal of biological chemistry* 280, 2847-2856.

Tipton KD, Ferrando AA, Phillips SM, Doyle D, Jr. & Wolfe RR. (1999). Postexercise net protein synthesis in human muscle from orally administered amino acids. *The American journal of physiology* 276, E628-634.

Tipton KD & Wolfe RR. (2004). Protein and amino acids for athletes. *Journal of sports sciences* 22, 65-79.

tel-00719700, version 1 - 20 Jul 2012

Tipton KD & Witard OC. (2007). Protein requirements and recommendations for athletes: relevance of ivory tower arguments for practical recommendations. *Clinics in sports medicine* 26, 17-36.

Tischler ME, Desautels M & Goldberg AL. (1982). Does leucine, leucyl-tRNA, or some metabolite of leucine regulate protein synthesis and degradation in skeletal and cardiac muscle? *The Journal of biological chemistry* 257, 1613-1621.

Tischler ME, Rosenberg S, Satarug S, Henriksen EJ, Kirby CR, Tome M & Chase P. (1990). Different mechanisms of increased proteolysis in atrophy induced by denervation or unweighting of rat soleus muscle. *Metabolism: clinical and experimental* 39, 756-763.

Topinkova E. (2008). Aging, disability and frailty. *Annals of nutrition & metabolism* 52 Suppl 1, 6-11.

Toth MJ, Matthews DE, Tracy RP & Previs MJ. (2005). Age-related differences in skeletal muscle protein synthesis: relation to markers of immune activation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 288, E883-891.

Tran H, Brunet A, Griffith EC & Greenberg ME. (2003). The many forks in FOXO's road. *Sci STKE* 2003, RE5.

Trappe TA, Burd NA, Louis ES, Lee GA & Trappe SW. (2007). Influence of concurrent exercise or nutrition countermeasures on thigh and calf muscle size and function during 60 days of bed rest in women. *Acta physiologica (Oxford, England)* 191, 147-159.

Tremblay F, Gagnon A, Veilleux A, Sorisky A & Marette A. (2005). Activation of the mammalian target of rapamycin pathway acutely inhibits insulin signaling to Akt and glucose transport in 3T3-L1 and human adipocytes. *Endocrinology* 146, 1328-1337.

Tseng BS, Kasper CE & Edgerton VR. (1994). Cytoplasm-to-myonucleus ratios and succinate dehydrogenase activities in adult rat slow and fast muscle fibers. *Cell and tissue research* 275, 39-49.

Tsujimoto Y. (2003). Cell death regulation by the Bcl-2 protein family in the mitochondria. *Journal of cellular physiology* 195, 158-167.

Van Der Heide LP, Hoekman MF & Smidt MP. (2004). The ins and outs of FoxO shuttling: mechanisms of FoxO translocation and transcriptional regulation. *The Biochemical journal* 380, 297-309.

van der Meer SF, Jaspers RT, Jones DA & Degens H. (2011). Time-course of changes in the myonuclear domain during denervation in young-adult and old rat gastrocnemius muscle. *Muscle & nerve* 43, 212-222.

van Loo G, Schotte P, van Gurp M, Demol H, Hoorelbeke B, Gevaert K, Rodriguez I, Ruiz-Carrillo A, Vandekerckhove J, Declercq W, Beyaert R & Vandenabeele P. (2001). Endonuclease G: a mitochondrial protein released in apoptosis and involved in caspase-independent DNA degradation. *Cell death and differentiation* 8, 1136-1142.

Vandenburgh HH, Hatfaludy S, Karlisch P & Shansky J. (1989). Skeletal muscle growth is stimulated by intermittent stretch-relaxation in tissue culture. *The American journal of physiology* 256, C674-682.

Vandenburgh HH, Hatfaludy S, Sohar I & Shansky J. (1990). Stretch-induced prostaglandins and protein turnover in cultured skeletal muscle. *The American journal of physiology* 259, C232-240.

Vandervoort AA, Kramer JF & Wharram ER. (1990). Eccentric knee strength of elderly females. *Journal of gerontology* 45, B125-128.

tel-00719700, version 1 - 20 Jul 2012

Vandervoort AA. (2002). Aging of the human neuromuscular system. *Muscle & nerve* 25, 17-25.

Vargas R & Lang CH. (2008). Alcohol accelerates loss of muscle and impairs recovery of muscle mass resulting from disuse atrophy. *Alcoholism, clinical and experimental research* 32, 128-137.

Vazeille E, Codran A, Claustre A, Averous J, Listrat A, Bechet D, Taillandier D, Dardevet D, Attaix D & Combaret L. (2008). The ubiquitin-proteasome and the mitochondria-associated apoptotic pathways are sequentially downregulated during recovery after immobilization-induced muscle atrophy. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 295, E1181-1190.

Vazeille E, Slimani L, Claustre A, Magne H, Labas R, Bechet D, Taillandier D, Dardevet D, Astruc T, Attaix D & Combaret L. (2011). Curcumin treatment prevents increased proteasome and apoptosome activities in rat skeletal muscle during reloading and improves subsequent recovery. *The Journal of nutritional biochemistry*.

Verdijk LB, Koopman R, Schaart G, Meijer K, Savelberg HH & van Loon LJ. (2007). Satellite cell content is specifically reduced in type II skeletal muscle fibers in the elderly. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 292, E151-157.

Verhagen AM, Ekert PG, Pakusch M, Silke J, Connolly LM, Reid GE, Moritz RL, Simpson RJ & Vaux DL. (2000). Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell* 102, 43-53.

Verhoeven S, Vanschoonbeek K, Verdijk LB, Koopman R, Wodzig WK, Dendale P & van Loon LJ. (2009). Long-term leucine supplementation does not increase muscle mass or strength in healthy elderly men. *The American journal of clinical nutrition* 89, 1468-1475.

Vescovo G, Ravara B & Dalla Libera L. (2008). Skeletal muscle myofibrillar protein oxidation and exercise capacity in heart failure. *Basic research in cardiology* 103, 285-290.

Visser M, Pahor M, Taaffe DR, Goodpaster BH, Simonsick EM, Newman AB, Nevitt M & Harris TB. (2002). Relationship of interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha with muscle mass and muscle strength in elderly men and women: the Health ABC Study. *The journals of gerontology* 57, M326-332.

Voges D, Zwickl P & Baumeister W. (1999). The 26S proteasome: a molecular machine designed for controlled proteolysis. *Annual review of biochemistry* 68, 1015-1068.

Volpi E, Mittendorfer B, Wolf SE & Wolfe RR. (1999). Oral amino acids stimulate muscle protein anabolism in the elderly despite hig Volpi E, Sheffield-Moore M, Rasmussen BB & Wolfe RR. (2001). Basal muscle amino acid kinetics and protein synthesis in healthy young and older men. *Jama* 286, 1206-1212.

Volpi E, Sheffield-Moore M, Rasmussen BB & Wolfe RR. (2001). Basal muscle amino acid kinetics and protein synthesis in healthy young and older men. *Jama* 286, 1206-1212.

Volpi E, Kobayashi H, Sheffield-Moore M, Mittendorfer B & Wolfe RR. (2003). Essential amino acids are primarily responsible for the amino acid stimulation of muscle protein anabolism in healthy elderly adults. *The American journal of clinical nutrition* 78, 250-258.

Wakimoto P & Block G. (2001). Dietary intake, dietary patterns, and changes with age: an epidemiological perspective. *The journals of gerontology* 56 Spec No 2, 65-80.

Walczak H, Degli-Esposti MA, Johnson RS, Smolak PJ, Waugh JY, Boiani N, Timour MS, Gerhart MJ, Schooley KA, Smith CA, Goodwin RG & Rauch CT. (1997). TRAIL-R2: a novel apoptosis-mediating receptor for TRAIL. *The EMBO journal* 16, 5386-5397.

tel-00719700, version 1 - 20 Jul 2012

Wang X, Li W, Williams M, Terada N, Alessi DR & Proud CG. (2001). Regulation of elongation factor 2 kinase by p90(RSK1) and p70 S6 kinase. *The EMBO journal* 20, 4370-4379.

Wang X & Proud CG. (2006). The mTOR pathway in the control of protein synthesis. *Physiology (Bethesda, Md* 21, 362-369.

Washington TA, White JP, Davis JM, Wilson LB, Lowe LL, Sato S & Carson JA. (2011). Skeletal muscle mass recovery from atrophy in IL-6 knockout mice. *Acta physiologica (Oxford, England)* 202, 657-669.

Welle S, Thornton C, Jozefowicz R & Statt M. (1993). Myofibrillar protein synthesis in young and old men. *The American journal of physiology* 264, E693-698.

Welle S, Thornton C, Statt M & McHenry B. (1994). Postprandial myofibrillar and whole body protein synthesis in young and old human subjects. *The American journal of physiology* 267, E599-604.

Welle S. (2002). Cellular and molecular basis of age-related sarcopenia. *Canadian journal of applied physiology = Revue canadienne de physiologie appliquee* 27, 19-41.

Welle S, Brooks AI, Delehanty JM, Needler N & Thornton CA. (2003). Gene expression profile of aging in human muscle. *Physiological genomics* 14, 149-159.

Whitman SA, Wacker MJ, Richmond SR & Godard MP. (2005). Contributions of the ubiquitin-proteasome pathway and apoptosis to human skeletal muscle wasting with age. *Pflugers Arch* 450, 437-446.

Wiederanders B & Oelke B. (1984). Accumulation of inactive cathepsin D in old rats. *Mechanisms of ageing and development* 24, 265-271.

Wilkes EA, Selby AL, Atherton PJ, Patel R, Rankin D, Smith K & Rennie MJ. (2009). Blunting of insulin inhibition of proteolysis in legs of older subjects may contribute to age-related sarcopenia. *The American journal of clinical nutrition* 90, 1343-1350.

Willems ME, Miller GR, Stauber FD & Stauber WT. (2010). Effects of repeated lengthening contractions on skeletal muscle adaptations in female rats. *J Physiol Sci* 60, 143-150.

Williamson DL, Kimball SR & Jefferson LS. (2005). Acute treatment with TNF-alpha attenuates insulin-stimulated protein synthesis in cultures of C2C12 myotubes through a MEK1-sensitive mechanism. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 289, E95-104.

Wilson J, Figueroa A, Panton L & Jeong-su K. (2008). HMB in individuals after the age of 55. *Florida State University MuscleLab, Lab presentation*.

Wolfe RR & Miller SL. (1999). Amino acid availability controls muscle protein metabolism. *Diabetes, nutrition & metabolism* 12, 322-328.

Wolfe RR. (2002). Regulation of muscle protein by amino acids. *The Journal of nutrition* 132, 3219S-3224S.

Wozniak AC, Kong J, Bock E, Pilipowicz O & Anderson JE. (2005). Signaling satellite-cell activation in skeletal muscle: markers, models, stretch, and potential alternate pathways. *Muscle & nerve* 31, 283-300.

Yang Y & Yu X. (2003). Regulation of apoptosis: the ubiquitous way. *Faseb J* 17, 790-799.

Yarasheski KE, Pak-Loduca J, Hasten DL, Obert KA, Brown MB & Sinacore DR. (1999). Resistance exercise training increases mixed muscle protein synthesis rate in frail women and men >/=76 yr old. *The American journal of physiology* 277, E118-125.

tel-00719700, version 1 - 20 Jul 2012

Yazawa A, Watanabe K, Yoshida Y, Imaki M & Tanada S. (2007). Relationship between physical activity measured by accelerometer and muscle mass, physical fitness and blood test values in middle-aged and elderly people. *J Anal Biosci* 30, 279-285.

Yimlamai T, Dodd SL, Borst SE & Park S. (2005). Clenbuterol induces muscle-specific attenuation of atrophy through effects on the ubiquitin-proteasome pathway. *J Appl Physiol* 99, 71-80.

Yokogoshi H, Takase S, Goda T & Hoshi T. (1990). Effects of suspension hypokinesia/hypodynamia on the body weight and nitrogen balance in rats fed with various protein concentrations. *Agricultural and biological chemistry* 54, 779-789.

Yoshizawa F, Kimball SR & Jefferson LS. (1997). Modulation of translation initiation in rat skeletal muscle and liver in response to food intake. *Biochemical and biophysical research communications* 240, 825-831.

Yoshizawa F, Kimball SR, Vary TC & Jefferson LS. (1998). Effect of dietary protein on translation initiation in rat skeletal muscle and liver. *The American journal of physiology* 275, E814-820.

You JS, Park MN & Lee YS. (2010). Dietary fish oil inhibits the early stage of recovery of atrophied soleus muscle in rats via Akt-p70s6k signaling and PGF2alpha. *The Journal of nutritional biochemistry* 21, 929-934.

Young VR, Munro HN & Fukagawa N. (1989). Protein and functional consequences of deficiency. Horwitz, A., Macfayden, D.M., Munro, H., Scrimshaw, N.S., Steen, B., Williams, T.F. Nutrition in the Elderly. *Oxford University New York*, 65-84.

Yu BP & Chung HY. (2006). Adaptive mechanisms to oxidative stress during aging. *Mechanisms of ageing and development* 127, 436-443.

Zadik Z, Chalew SA, McCarter RJ, Jr., Meistas M & Kowarski AA. (1985). The influence of age on the 24-hour integrated concentration of growth hormone in normal individuals. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 60, 513-516.

Zalewska T, Thompson VF & Goll DE. (2004). Effect of phosphatidylinositol and inside-out erythrocyte vesicles on autolysis of mu- and m-calpain from bovine skeletal muscle. *Biochimica et biophysica acta* 1693, 125-133.

Zarzhevsky N, Menashe O, Carmeli E, Stein H & Reznick AZ. (2001a). Capacity for recovery and possible mechanisms in immobilization atrophy of young and old animals. *Annals of the New York Academy of Sciences* 928, 212-225.

Zarzhevsky N, Carmeli E, Fuchs D, Coleman R, Stein H & Reznick AZ. (2001b). Recovery of muscles of old rats after hindlimb immobilisation by external fixation is impaired compared with those of young rats. *Experimental gerontology* 36, 125-140.

Zdanowicz MM & Teichberg S. (2003). Effects of insulin-like growth factor-1/binding protein-3 complex on muscle atrophy in rats. *Experimental biology and medicine (Maywood, NJ* 228, 891-897.

Zhao J, Brault JJ, Schild A, Cao P, Sandri M, Schiaffino S, Lecker SH & Goldberg AL. (2007). FoxO3 coordinately activates protein degradation by the autophagic/lysosomal and proteasomal pathways in atrophying muscle cells. *Cell metabolism* 6, 472-483.

Zong WX, Li C, Hatzivassiliou G, Lindsten T, Yu QC, Yuan J & Thompson CB. (2003). Bax and Bak can localize to the endoplasmic reticulum to initiate apoptosis. *The Journal of cell biology* 162, 59-69.

Zou H, Li Y, Liu X & Wang X. (1999). An APAF-1.cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *The Journal of biological chemistry* 274, 11549-11556.

tel-00719700, version 1 - 20 Jul 2012