



HAL
open science

Rôle de la sélénoprotéine P et de la glutathion peroxydase 3 dans le phénotype des macrophages et la régénération musculaire

Jessica de Oliveira Bouvière

► To cite this version:

Jessica de Oliveira Bouvière. Rôle de la sélénoprotéine P et de la glutathion peroxydase 3 dans le phénotype des macrophages et la régénération musculaire. Biologie cellulaire. Université de Lyon, 2019. Français. NNT : 2019LYSE1167 . tel-02437485

HAL Id: tel-02437485

<https://theses.hal.science/tel-02437485>

Submitted on 13 Jan 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.



N°d'ordre NNT : 2018LYSE1167

THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON

opérée au sein de
l'Université Claude Bernard Lyon 1

Ecole Doctorale N° 205
ECOLE DOCTORALE INTERDISCIPLINAIRE SCIENCES-SANTE
(EDISS)

Spécialité de doctorat : BIOLOGIE CELLULAIRE

Soutenue publiquement le 30/09/2019, par :

Jessica BOUVIERE

Rôle de la sélénoprotéine P et de la glutathion peroxydase 3 dans le phénotype des macrophages et la régénération musculaire

Devant le jury composé de :

Pialoux, Vincent	PU-HDR Université Lyon 1	Président
Dumont, Nicolas	PR Université de Montréal	Examineur
Rousseau, Anne-Sophie	MCU-HDR Université Nice Sophia Antipolis	Rapporteuse
Vaulont, Sophie	DR-HDR Institut Cochin	Rapporteuse
Mounier, Rémi	DR-HDR Université Lyon 1	Directeur de thèse

*“We especially need imagination in science.
It is not all mathematics, nor all logic,
but it is somewhat beauty and poetry.”*

Maria Montessori

*À ma mère et à ma grand-mère,
elles sauront pourquoi...*

REMERCIEMENTS

C'est grâce à l'aide de nombreuses personnes, lesquelles je serai toujours reconnaissante, que j'ai pu mener cette thèse à son terme.

Je voudrais tout d'abord remercier énormément mon directeur de thèse, Rémi Mounier.

Tout a commencé le 9 juillet 2015 lorsque j'ai t'envoyé une candidature spontanée à 9h09 et que tu m'as répondu à 9h38 en fixant un RDV par Skype le lendemain, entretien, qui a amené à une visite au laboratoire deux jours plus tard et le début de l'écriture d'un projet pour une demande de financement. Cette réactivité a été le premier exemple de dynamisme et d'efficacité que j'ai essayé de suivre tout au long de ma thèse. Plus que cela, ta confiance et optimisme ont également été essentiels pour que je puisse passer à l'étape suivante... mention spéciale à la période de l'oral au Keystone, une nouvelle que d'ailleurs tu as reçu avec plein d'enthousiasme (« je ne sais pas si ça va le faire, Rémi » « mais qu'est-ce que tu me racontes là, Jessica ? Allez ! »), au début de l'écriture de ma thèse qui a été très dur (« ça va le faire, tu as la source ») et pendant les recherches de postdoc (« Jessica va déjeuner avec lui, il bosse avec macrophage »). Merci de m'avoir permis de savoir comment fonctionne une demande de financement (et d'y avoir participé !). Je suis reconnaissante de tout l'investissement scientifique et financière qui tu as fait pour que je puisse avoir une formation de haut niveau. Encore une fois merci pour les corrections sur le contenu de tous mes textes, qui me faisait beaucoup réfléchir (« C'est vrai, comme ça la phrase est meilleure ») ; pour laisser libre cours à ma curiosité et tester mes hypothèses ; pour être toujours si dynamique donnant l'exemple de l'importance d'avoir un bon réseau scientifique pour l'avancée de la recherche (...raison pour laquelle je me suis motivée à m'inscrire à la sélection d'organiseurs du congrès de biologie cellulaire à Paris). Merci mille fois.

Je remercie également Bénédicte Chazaud qui m'a acceptée au sein de son équipe et m'a suivi de près pendant toute ma première année de thèse m'offrant toujours la possibilité d'apprendre des bonnes stratégies scientifiques. Merci pour les plusieurs formations telles que les bonnes pratiques de la culture cellulaire, la gestion de plusieurs lignées des souris en ligne et à l'animalerie, un chemin que d'ailleurs on parcourait toute la semaine ensemble et qui me permettait de te raconter quelques moments angoissants afin de suivre tes conseils (« des fois je pense que je ne vais pas assez vite, ça m'énerve » « Jessica, il y avait un étudiant qui

réfléchissait beaucoup avant de faire les manip mais on profitait 100% de tout ce qu'il faisait. Donc le plus important est de bien savoir ce que tu fais avant d'aller à la paillasse. Prends ton temps, la vitesse va venir »). Ces précieux moments mon permis de me ressaisir et je les ai tous retenus. Merci de m'avoir donné l'opportunité de participer à d'autres travaux du laboratoire qui m'ont permis de faire connaissance avec d'autres techniques, d'autres environnements scientifiques (comme par exemple le modèle de régénération en poisson-zèbre à Londres) et qui m'ont également permis d'être signataire du mon premier article comme co-première auteur. Merci pour la confiance et pour ton investissement mis en disposition de ma formation.

Je tiens à remercier Mme Vaulont et Mme Rousseau qui m'ont fait l'honneur d'être rapporteurs de ma thèse, elles ont pris le temps de m'écouter et de discuter pendant des heures avec moi au téléphone. Leurs remarques m'ont permis d'envisager mon travail sous un autre angle. Pour tout cela je les remercie.

Je tiens à remercier également M. Dummont et M. Pialoux pour avoir accepté de participer à mon jury de thèse et pour la contribution scientifique ainsi que le temps consacré à l'évaluation de mon travail de recherche.

Je remercie également à Julien Gondin qui a apporté à l'équipe une différente et intéressante thématique qui m'a stimulé dans ma réflexion sur les macrophages d'une façon encore plus vaste. Merci pour ta bonne humeur et particulièrement pour ton aide au moment de l'écriture du résumé du Keystone, où au dernier moment j'étais désespérée avec le nombre limité de mots et tu m'as montré comment dire 3 phrases en 1 seule... (maintenant je pense toujours à ça, merci !!!).

Merci à Guy Mouchiroud pour les contributions scientifiques toujours très pertinentes pendant les séminaires du groupe qui me faisaient toujours réfléchir et faire la biblio ensuite. Pour le soutien très important et inoubliable au moment de la célébration de mon papier comme co-première auteur. Merci pour toutes les bouteilles de champagne que tu as ouvert ce jour-là et pour avoir partagé ce moment d'émotion avec un grand câlin.

Il m'est impossible d'oublier Gaëtan, pour son aide précieuse pour ma recherche. Tu as été toujours très disponible pour quoi que ce soit. Merci pour les nombreuses heures au Facs en train de discuter sur le meilleur gate pour évaluer les populations des macrophages, pour ton

enthousiasme sur une possible sous-population intermédiaire. Merci pour m'avoir toujours montré une nouvelle façon de penser sur une technique et d'analyser les résultats. Tu mérites tellement d'avoir un poste au CNRS, je croise les doigts pour toi, Gaëtan !

Je remercie également tous les thésards avec qui j'ai partagé ces années de thèse.

Linda, toujours avec un beau sourire, tu as joué un rôle important à mon arrivée à Lyon. C'était un moment de changement pour moi et tu m'as aidé en plusieurs aspects, dès les visites aux appartements jusqu'à les manips au labo. Merci aussi pour les soirées shopping à la Part-Dieu (et finalement on n'a pas encore acheté ensemble chez Zara... haha).

Emmeran, pour ton sens de l'humour qui me faisait rigoler énormément (« Jessica labo cool » ; « Hey bambam comment-vas tu ? » ; « C'est le chaaarme » Ah d'accooooord »). Pour ton aide avec la biblio macrophage (« Hey Bouviere, faut que tu lises O'Neill, Lynch, Ido, etc etc etc »), pour toutes les discussions scientifiques (eh bien voilà... le récepteur mannose, les technologies RNAseq, Single-cell...).

Aurélie, pour la très bonne relation que nous avons eu qui a rendu une collaboration scientifique (à laquelle je suis fier d'avoir participé) et une amitié en dehors du labo.

Laure, pour ta sensibilité émouvante qui me permettait de voir les événements d'un autre angle. Merci de m'avoir accueilli chez toi pour participer à un moment en famille comme le week-end de Pâque. C'était très importante pour moi !

Thibaut (Titi), Jimmy (Mimi) et Huong (Dieu) mes coups de cœur de cette thèse ! J'avais pensé remercier chacun d'entre vous de façon séparée mais je me suis rendue compte qu'on ne se séparera jamais. Merci à vous pour l'opportunité d'avoir fait pendant cette période de ma vie, plus que grands amis, des frères et sœurs que j'emmènerai avec moi pour toujours. Merci pour les nombreuses soirées qui me faisaient rigoler et resteront toujours dans ma mémoire. Titi, merci également pour l'aide avec les plusieurs manips-macrophages. Mimi, merci à toi aussi pour l'aide, en particulier avec la production des nombreux virus pour l'essai d'infection des macrophages. Dieu, ma sœur perdue au Vietnam ! Tu es arrivée il n'y a même pas un an et il me semble t'avoir connu il y a longtemps. Merci pour ton bon sens, ton discernement des circonstances quand j'étais énervée.

Je tiens à remercier également toutes les ingénieures et la nouvelle post-doc avec qui j'ai passé de très bons moments.

Michèle (Mimich), la reine du Facs, merci pour l'aide pendant ces 3 ans, avec des nombreuses manips ! Merci pour ta gentillesse et pour tes conseils toujours raisonnables qu'ont été très importants pour moi.

Sabrina (Sabri), la dynamique ! Tu as été la première avec qui j'ai appris les manips classiques du laboratoire et à gagner la vitesse nécessaire pour faire le maximum de manips de manière efficiente (« Bon, nous avons 20 minutes de centri... en attendant on descend à l'azote, on décongèle des cellules, on passe les myoblastes..... haha »). Merci pour avoir été là quand tout était flou dans ma tête et également pour les remarquables conseils.

Peggy, les mains d'ange. Merci pour les impeccables injections de cardiotoxine tout au long de ces années (« 100% bien injecté ! ohlala tu ne rates jamais »), pour me montrer toujours une façon plus simple de disséquer un tissu, pour les pauses-café... Merci !

Eugenie, merci pour ta douceur et pour avoir apporté toujours la sérénité nécessaire aux moments adéquats dans le laboratoire.

Anitta, merci pour ton sourire et pour l'agréable conversation au labo et au bar.

Je tiens à remercier également l'ancienne membre du laboratoire Marine, avec laquelle je n'ai pas eu l'occasion de travailler mais qui était là pendant ma visite au laboratoire en 2015 et mon arrivé en 2016 et qui m'a accueilli de façon très gentille.

Merci également aux autres membres qui ne sont pas restés longtemps mais le temps nécessaire pour m'avoir marqué. Cécile, Sophie, André, Camille, Mathilde, Marie, Hugo, Tiffany, Trirupa, Fatima, Roxane, Olivia, Emilie, Ines, Lui et Justine ma stagiaire avec qui j'ai passé quelques semaines très agréables.

Pour finir, je tiens à remercier très chaleureusement ma famille pour son soutien indéfectible.

Ma douce mère et grand-mère (in memoriam), seuls nous connaissons notre histoire et tout ce que nous avons vécu ensemble. Je ferai toujours le possible et aussi l'impossible pour que tous les sacrifices que vous avez faits pour moi soient vains et source de fierté.

Mon cher père, mon exemple de force, travail, honnêteté, succès et responsabilité. Tu as toujours été engagé avec mon parcours professionnel et sans mesure d'efforts tu m'as conduit au meilleur chemin pour que je puisse avoir la meilleure formation. Merci d'avoir cru en moi et d'avoir investi tellement à ça. Je serai toujours à la hauteur de ta confiance. Merci également de m'avoir aidé à prendre les décisions avec moins d'émotion. Tu es mon équilibre et cette victoire je la dédie à toi aussi.

Ma sœur, ma princesse, merci pour tes encouragements pendant la transition Brésil-France en 2015 et pendant la durée de la thèse.

Mon mari, celui sans qui rien de tout cela ne serait possible, celui qui a cru en moi quand moi je n'y croyais pas, qui m'a toujours donné l'exemple de persévérance et de travail dur. Source d'inspiration. Nous avons vécu des moments très nébuleux pendant cette période mais je n'oublierai jamais que c'était l'expérience la plus belle de ma vie et que sans toi je ne serais probablement pas là. C'était grâce à ton opportunité professionnelle que je suis venue en France. Je t'ai toujours dit que je voulais un jour vivre dans ce pays et tu m'as dit « je ferai de ton rêve une réalité ». Merci pour tous les efforts que tu as faits pour moi (les repas pendant le week-end en compagnie de la thématique sélénoprotéine-macrophage inclus... haha « alors, laisse-moi te raconter la nouvelle découverte relative au récepteur Trem » « mon Dieu, elle n'arrête pas... oui oui je t'écoute »), pour l'exemple scientifique admirable que tu m'as toujours transmis depuis l'époque de mon master et que j'ai essayé de retenir pour faire pareil.

Merci ! À vous tous qui m'avez fait vivre 10 ans en 4 ans, tellement tout ça a été intense.

Résumés

Rôle de la sélénoprotéine P et de la glutathion peroxydase 3 dans le phénotype des macrophages et la régénération musculaire

Après une lésion musculaire, la réparation du tissu est régulée par différentes cellules et notamment par les macrophages qui orchestrent à la fois la réponse inflammatoire et la résolution de l'inflammation, permettant la régénération tissulaire. Après une lésion, les macrophages pro-inflammatoires activent la prolifération des cellules myogéniques et phagocytent les débris cellulaires. Ce processus cellulaire promeut l'activation d'un état anti-inflammatoire des macrophages qui stimule la fusion des cellules myogéniques. Les effecteurs grâce auxquels les macrophages anti-inflammatoires ont des effets pro-myogéniques sont peu décrits. Grâce à un transcriptome/sécrétome comparant les protéines sécrétées par les macrophages humains pro et anti-inflammatoires, nous avons identifié deux molécules antioxydantes : la sélénoprotéine P (SEPP1) et la glutathion peroxydase 3 (GPX3) dont les fonctions restent faiblement caractérisées dans la biologie musculaire et l'inflammation. Nos résultats montrent que GPX3 et SEPP1 sont impliqués dans la fonction anti-inflammatoire des macrophages, dans la stimulation des dernières étapes de la myogenèse. *In vivo*, ces deux sélénoprotéines sont nécessaires à l'homéostasie du muscle squelettique. En utilisant un modèle de lésion du muscle squelettique d'animaux dépourvus de sélénoprotéine dans les macrophages (modèle $LysM^{Cre/+} Sepp1^{fl/fl}$), nous avons constaté que l'absence de SEPP1 perturbe le passage d'un phénotype pro-inflammatoire vers un phénotype anti-inflammatoire au cours de la régénération musculaire.

Ainsi, nous avons mis en évidence pour la première fois le rôle des sélénoprotéines sécrétées par les macrophages dans la réparation des tissus, établissant un lien entre molécules antioxydantes et résolution de l'inflammation.

Role of selenoprotein P and glutathione peroxidase 3 in macrophage phenotype and skeletal muscle regeneration

Tissue repair after skeletal muscle injury is supported by various cells and notably by macrophages that orchestrate both the inflammatory response, the resolution of inflammation and the recovery phase allowing tissue recovery. After injury, pro-inflammatory macrophages activate myogenic cell proliferation and phagocytose debris. At the time of resolution of inflammation, macrophages switch their phenotype to acquire an anti-inflammatory state, which stimulates the fusion of myogenic cells into multinucleated myofibers. The effectors by which anti-inflammatory macrophages sustain their pro-myogenic effect are poorly known. Thanks to a transcriptomic/secretomic screen comparing the secretome of pro- and anti-inflammatory human macrophages, we identified two anti-oxidant molecules that are two selenoproteins: selenoprotein P (SEPP1) and glutathione peroxidase 3 (GPX3), which functions remain poorly characterized in both muscle biology and inflammation. Macrophage-derived GPX3 and SEPP1 are involved in the function of anti-inflammatory macrophages in the stimulation of the late steps of myogenesis. *In vivo*, these two selenoproteins are necessary for the homeostasis of skeletal muscle. Moreover, using a skeletal muscle injury model of animals lacking selenoprotein within macrophages (LysM^{Cre/+}Sepp1^{fl/fl} model) we found that the absence of SEPP1 impaired the transition from a pro to an anti-inflammatory phenotype during skeletal muscle regeneration.

Thus, we have demonstrated for the first time the role of selenoproteins secreted by macrophages in tissue repair establishing a link between antioxidant molecules and inflammation resolution.

Introduction des travaux de thèse

Mon travail principal de thèse porte sur l'interaction des macrophages provenant de la moelle osseuse, présents dans le microenvironnement du muscle squelettique pendant l'inflammation au cours de la régénération musculaire. Notre équipe a souligné l'importance des macrophages au cours de l'inflammation musculaire, notamment dans les modèles de régénération et de pathologies musculaires (Saclier et al., 2003 ; Arnold et al., 2007 ; Arnold et al., 2015 ; Varga and Mounier et al., 2016 ; Mounier et al., 2013 ; Juban et al., 2018).

Des nombreuses fonctions biologiques contribuant à l'homéostasie musculaire ont été décrites, comme par exemple l'induction de la prolifération musculaire par les macrophages pro-inflammatoires médié par les cytokines IL-6, IL1- β , IL-13 et TNF α (Saclier et al., 2013). Les macrophages anti-inflammatoires peuvent également contribuer à l'homéostasie du muscle squelettique en soutenant la fusion des cellules précurseurs myogéniques par la sécrétion des molécules, comme TGF β et GDF3 (Saclier et al., 2013 ; Varga and Mounier et al., 2016). Récemment, à l'aide d'un transcriptome provenant des macrophages pro et anti-inflammatoires humains, notre équipe a identifié la présence de nouvelles molécules exprimées par les macrophages. Parmi celles-là, les deux sélénoprotéines plus exprimées (sélénoprotéine P et glutathion peroxydase 3) ont été identifiées comme des molécules sécrétées à l'aide d'un sécrétome virtuel qui permet la détection de peptides signaux. Ainsi, nous avons étudié le rôle des sélénoprotéines pendant les étapes de la myogenèse et de la régénération du muscle squelettique.

Nous avons montré que ces molécules agissent sur le phénotype des macrophages *in vitro* et *in vivo* et que par conséquent les fonctions des macrophages en absence des sélénoprotéines ont été perturbées, altérant la myogenèse et la régénération musculaire. Ainsi, dans cette étude nous avons démontré pour la première fois le rôle autocrine de molécules sécrétées par les macrophages : la sélénoprotéine P et la glutathion peroxydase 3. De plus, comme il a été mentionné précédemment, au cours de l'inflammation du muscle squelettique deux phénotypes de macrophages ont été identifiés jusqu'à présent : pro-inflammatoire et anti-inflammatoire. Cependant, de façon originale, ce travail évoque la présence d'une troisième population de macrophages présente tout au long de la régénération musculaire, appelé de population intermédiaire. De plus, en absence de la sélénoprotéine P ce nouveau phénotype de macrophage décrit est perturbé pendant l'inflammation du muscle squelettique, soulignant l'importance de ces molécules à l'homéostasie musculaire.

Une deuxième étude a été réalisée afin d'étudier le rôle trophique d'autres molécules, qui constituent la matrice extracellulaire. Ces molécules appelées glycosaminoglycanes sont présentes pendant la régénération du muscle squelettique et régulent le processus de différenciation des myoblastes en myotubes (Barbosa et al., 2005). Cependant, les interactions entre ces molécules et le microenvironnement du muscle squelettique restent encore mal décrites. En utilisant un modèle de régénération musculaire et un composé d'agent régénératif (RGTA) dont les glycosaminoglycanes ont été synthétisés, nous avons démontré que ces molécules interagissent avec les cellules endothéliales, favorisent leur maturation et soutenant la fusion de myocytes pour former des nouveaux myotubes *in vitro* ainsi que des myofibres *in vivo*.

Dans une troisième étude présentée dans cette thèse, cette fois-ci méthodologique, nous avons proposé un nouvel outil pour quantifier l'aire de section transversale du muscle squelettique de façon semi-automatique en utilisant le logiciel Image J, qui a été utilisé pour les analyses des deux premières études de ma thèse.

Ces études ont contribué à l'amélioration de la compréhension des interactions cellulaires pendant la régénération musculaire, i) par l'identification et la caractérisation du rôle indirect de molécules secrétées par les macrophages, ii) par la caractérisation du rôle trophique de molécules synthétiques, qui interagissent avec les cellules endothéliales, sur le muscle squelettique et iii) par le développement d'un nouvel outil méthodologique qui optimise le temps d'analyse de l'aire des fibres musculaires.

Sommaire

REMERCIEMENTS	6
RÉSUMÉS	12
INTRODUCTION DES TRAVAUX DE THÈSE	14
ABRÉVIATIONS	20
TABLE DES ILLUSTRATIONS	26
INTRODUCTION	28
<i>1. LE MUSCLE SQUELETTIQUE ET LES ETAPES DE LA MYOGENÈSE</i>	29
1.1 Constitution générale du muscle squelettique et l'impact des nouveaux concepts	29
1.2 La composition des myofibres influençant les propriétés musculaires métaboliques	32
1.3 Les voies de signalisation impliquées dans la myogenèse.....	35
<i>2. LA RÉGÉNÉRATION MUSCULAIRE ET LA RÉPONSE INFLAMMATOIRE ORCHESTRÉES PAR LES MACROPHAGES</i>	37
2.1 Le mécanisme de la régénération	38
2.2 Les signaux de recrutement et d'activation des macrophages	39
2.2.1 Les cytokines	44
2.2.2 Le paradigme du profil inflammatoire médié par l'IFN- γ et l'IL10.....	44
2.3 Les différents phénotypes de macrophages dans le processus inflammatoire	47
2.3.1 Macrophages pro inflammatoires (M1) et anti-inflammatoires (M2)	47
2.3.2 Macrophages Mox (M-ox).....	50
2.3.3 Macrophages associés à l'hémorragie (M-HA)	50
2.3.4 Macrophages dérivés de la chimiokine 3 (M-DC)	51
2.3.5 Macrophages anti-athérogeniques (M4)	52
2.4 Rôle de macrophages dérivés de la moelle osseuse dans la résolution de l'inflammation musculaire	53
2.5 Mécanismes moléculaires contrôlant l'activation des macrophages après une lésion musculaire	55
2.6 Cinétique d'activation de macrophages, ses phénotypes et profils métaboliques selon la durée de la lésion	57
<i>3. LE SÉLÉNIUM ET LES SÉLÉNOPROTÉINES</i>	61
3.1 Biosynthèse de la sélénoprotéine	59
3.2 L'incorporation de sélénocystéine dans les sélénoprotéines.....	60
3.2.1 L'élément SECIS et les partenaires protéiques	60
3.3 Sélénium : le micronutriment nécessaire à la sélénoprotéine fonctionnelle	61

3.3.1 L'importance physiologique de la sélénoprotéine fonctionnelle.....	67
3.4 Les sélénoprotéines eucaryotes	68
3.4.1 Les glutathion peroxydases.....	68
3.4.2 La sélénoprotéine P (Sepp1)	69
3.4.3 Les thiorédoxines réductases, la sélénoprotéine de 15 kDa (Sel15), la sélénoprotéine M (SELM), les déiodinases de type 1 (DIO1), 2 (DIO2) et 3 (DIO3) et le sélénophosphate synthétase 2 (SPS2)	71
3.4.4 Les sélénoprotéines W (SelW), V (SelV), T (SelT), H (SelH), O (SelO), I (SelI)	72
3.4.5 Le rôle des sélénoprotéines K (SelK), S (SelS) et N (SePN) dans la biologie cellulaire.....	72
4. LES EFFETS BIOLOGIQUES DE LA SÉLÉNOPROTÉINE P DANS LA CELLULE..	73
4.1 La sélénoprotéine P comme un antioxydant et un transporteur de sélénium chez les mammifères : un événement remarquable pour la biologie cellulaire	73
4.2 La sélénoprotéine P dans l'inflammation sur la régulation et fonctions cellulaires immunitaires	74
4.3 La sélénoprotéine P et le système musculaire.....	75
4.3.1 Contributions biologiques de la sélénoprotéine P à la physiologie du muscle squelettique et ses voies de signalisation	75
4.3.2 Le paradoxe du profil antioxydant de la sélénoprotéine P.....	76
5. LE CONTROLE DES ESPÈCES RÉACTIVES DE L'OXYGÈNE ET LES EFFETS ANTIOXYDANTS DE LA GLUTATHION PEROXYDASE 3	77
6. LA PROLIFÉRATION ET LA DIFFÉRENCIATION CELLULAIRE EN RÉPONSE A LA SEPP1 ET LA GPX3	80
OBJECTIFS DE LA THÈSE	82
ÉTUDE #1	86
MATÉRIEL ET MÉTHODES	88
RÉSULTATS.....	98
DISCUSSION.....	126
PERSPECTIVE	132
ÉTUDE #2	140
<i>Heparan sulfate mimetic accelerate post-injury skeletal muscle regeneration.....</i>	<i>142</i>
1. COMPOSANTS DE L'AGENT RÉGÉNÉRATIF (RGTA) ET LEURS EFFETS BIOLOGIQUES	143
1.1 Les mécanismes d'action moléculaires du RGTA.....	144
1.2 Le RGTA et la réparation tissulaire	144
1.3 RGTA dans la réparation du muscle squelettique	144

1.4 Le facteur différentiel de notre étude	145
Publication Scientifique	148
ÉTUDE #3	168
<i>Open-CSAM, a new tool for semi-automated analysis of myofiber cross-sectional area in regenerating adult skeletal muscle</i>	<i>170</i>
Publication Scientifique	172
PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES ET COMMUNICATIONS	184
RÉFÉRENCES	186

Abréviations

AICAR: 5-Aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide

Ang/Tie: Angiopoietin/Tie signalling

AKT: Protein Kinase B

AMP: Adenosine mono-phosphate

AMPK: AMP-Activated Kinase

Ang1: Angiopoietin-1

ApoE: Apolipoprotein E

ApoER-2: Apolipoprotein E receptor 2

Ap-1: Activator protein 1

ARG1: Arginase 1

Asn: Asparagine

ATP: Adenosine triphosphate

BCL6: B cell lymphoma 6

BDNF: Brain-derived neurotrophic factor

CCL-3: Chemokine (C-C motif) ligand 3

CCL18: Chemokine ligand 18

CCL20: Chemokine (C-C motif) ligand 20

CD36: Cluster of differentiation 36

CD80: T-lymphocyte activation antigen CD80

CD86: T-lymphocyte activation antigen CD86

CD163: Hemoglobin-haptoglobin scavenger receptor

CD206: Mannose receptor

CINC: Cytokine-induced neutrophil chemoattractant

cGAS: GMP-AMP synthase cyclique

CREB: C-AMP Response Element-binding protein

CTX: Cardiotoxin

C2C12: Immortalized mouse myoblast cell line

C3aR: Complement component 3a receptor

COX-2: Cyclooxygenase-2

CXCL16: Chemokine (C-X-C motif) ligand 16

CX₃CR1: CX3C chemokine receptor 1

DAMPs: Damage-associated molecular patterns

Derlin-1: Degradation in the endoplasmic reticulum protein 1
DIO 1: Iodothyronine deiodinases type 1
DIO 2: Iodothyronine deiodinases type 2
DS: Danger signals
DUSP3: Dual-specific phosphatase 3
ECM: Extracellular matrix
EEFSEC: Eukaryotic Elongation Factor, Selenocysteine-TRNA Specific
EIF4A3: Eukaryotic Translation Initiation Factor 4A3
ERK: Extracellular signal-Regulated Kinase
ETC: Electron transport chain
FAP: Fibro/Adipogenic Precursor
FIZZ1/RELMa: Hypoxia-induced mitogenic factor
Fermt2: Fermitin 2
FMLP: Reconnaissance formyl peptide receptor 1
FPR2 : N-formyl peptide receptor 2
FRP: Formyl peptide Receptor
FRIZZLED7: G protein-coupled receptor for Wnt signaling proteins
GATA3: GATA binding protein 3
GATA6: GATA binding protein 6
GC: Glucocorticoid
GDF3: Growth Differentiation Factor 3
GPX3: Glutathione peroxidase 3
GR: Glucocorticoid Receptor
HBD: Heparin-binding domain
HMMS: Homeostatic, metabolic and modulatory signals
HMGB1: High mobility group box 1 protein
HIF1: Hypoxic Inducible Factor
His: Histidine
Hb/Hp: Hemoglobin-Haptoglobin Complex
H₂O₂: Hydrogen peroxide
HO: Heme oxygenase-1
IFGNR-1: Interferon-gamma receptor 1
IFGNR-2: Interferon-gamma receptor 2

IFN γ : Interferon-gamma
IGF: Insulin Growth Factor
IGF1: Insulin Growth Factor 1
iNOS: Inductible Nitric Oxide Synthase
IL-1: Interleukine 1 beta
IL-1 β : Interleukin 1 beta
IL-5: InterLeukine 5
IL-6: InterLeukine 6
IL-10: InterLeukine 10
IL-12: InterLeukine 12
IL-23: InterLeukine 23
IL1RII: Interleukin 1 receptor, type II
IL-2RA: Interleukin 2 receptor, alpha
IL-10R1: Interleukin 10 receptor 1
IL-10R2: Interleukin 10 receptor 2
IL-21R: Interleukin 21 receptor
IP-10: Interferon-inducible protein 10
IRFs: Interferon regulatory factors
JAK: Janus kinase
JAK1: Janus kinase 1
KO: Knock-Out
Lcn2: Lipocalin 2
LPS: Lipopolysaccharide
LRG1: Leucine-rich alpha-2-glycoprotein 1
Lrp1: Low density lipoprotein receptor-related protein 1
LRP2: Low density lipoprotein-related protein 2 or Megalin
LRX: Leucine-rich repeat extensins
LTBP4: Latent transforming growth factor beta binding protein 4
LysMS: LysM^{cre/+}; Sepp1^{fl/fl}
Ly6C: Lymphocyte antigen 6 complex
MHC-II: Major histocompatibility complex II
MIP-2: Macrophage-inflammatory protein 2
MARCO: Macrophage receptor with collagenous structure

MCP-1: Monocyte chemoattractant protein 1 (ou CCL2)
M-DC: Macrophages dérivés de la chimiokine 3
MKP-1: Mitogen-activated protein kinase phosphatase 1
MMP-1: Matrix metalloproteinase-1
M-ha: Macrophages associés à l'hémorragie
MIP-2 : Macrophage-inflammatory protein 2
M-ox: Macrophages Mox
MP: Macrophage
MPC: Muscle Precursor Cell
MYHC: Myosin heavy chain
MYOD: Myogenic Differentiation 1
Myf-5: Myogenic factor 5
MSC: Mesenchymal Stem Cell
MSRB1: Methionine-R-sulfoxide Reductase B1
mTORC: Mammalian Target of Rapamycin Complex
MRF: Myogenic Regulator Factor
MRF4: Myogenic regulatory factor
MuSC: Muscle Stem Cell
NAD: Nicotinamide adenine dinucleotide
NADP: Nicotinamide adenine dinucleotide Phosphate
NADPH: Hydrogen-peroxide oxidoreductase
NCoR: Nuclear receptor co-repressor 1
NFκB: Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
Nrf2: Nuclear factor erythroid 2-related factor 2
NO: Oxyde nitrique
NCL: Nucleulin
OXPHOS: Phosphorylation oxydative
O₂^{•-}: Superoxyde
ORF: Open reading frame
Pax: Homeodomain paried box
PAX7: Paired box 7
PPARγ: Peroxisome proliferator-activated Receptor

PI3K/AKT: Phosphoinositide-3-kinase–Akt
PKM2: Pyruvate kinase M2
PTP1B : Protein tyrosine phosphatase 1B
PTX3 : Pentraxin 3
P21: Cyclin-dependent kinase inhibitor 1
P53: Tumor protein 53
RIG-I: Retinoic acid-inducible gene I
RGTA: ReGeneraTing Agents
RPL30 : Ribosomal protein L30
RR-mTOR: Rapamycin resistant mice
Saa3: Serum amyloid A3
SC: Satellite cells
SDH: Succinate dehydrogenase
Se: Selenium
SECIS: Selenocysteine insertion sequence
SECISBP2: SECIS-binding protein 2
Ser: Serine
SIRT1: NAD-dependant deacetylase sirtuin-1
SNP: Single Nucleotide Polymorphism
Sepp1: Selenoprotein P
Sepps: Selenoproteins
SelW: Sélénoprotéine W
SOCS1: Suppressor of cytokine signaling protein 1
SOD: Superoxide dismutase
SPI-C: Heme-mediated SPI-Cinduction
SPS2: Selenophosphate synthetase 2
SREBP-1: Sterol regulatory element-binding transcription factor 1
STAT: Activator of transcription pathway
TA: Tibialis Anterior
TAM: Tumor-associated macrophages
TCA: Tricarboxylic acid
TGFβ: Transforming Growth Factor
Th2: T helper type 2

Thr: Threonin

Thr172: Threonin 172

TLR: Toll like receptor

TLR1: Toll like receptor 1

TLR3: Toll like receptor 3

TLR4: Toll like receptor 4

TLR8: Toll like receptor 8

TRNAU1AP: TRNA Selenocysteine 1 Associated Protein 1

TRX: Thioredoxins

TXNDR1: Thioredoxin reductase 1

TXN: Thioredoxin system

TNF α : Tumor Necrosis Factor a

T3: Triiodothyronine

T4: Thyroxine

VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor

VEGFA: Vascular endothelial growth factor A

Wnt/b-Caténine: Wnt/ β -catenin pathway

WT: Wild Type

Table des illustrations

<i>Figure 1. Schéma illustrant les composants d'un muscle</i>	31
<i>Figure 2. Les différents types de fibres musculaires</i>	34
<i>Figure 3. Les étapes de la myogenèse</i>	36
<i>Figure 4. Les différents stimulus d'activation de macrophages</i>	41
<i>Figure 5. Répression de la transcription génique du profil pro-inflammatoire de macrophages médié par le récepteur aux glucocorticoïdes et PPARγ</i>	43
<i>Figure 6. Les profils pro et anti-inflammatoires des macrophages médiés par l'IFN-γ ou l'IL10</i>	46
<i>Figure 7. Signatures moléculaires et métaboliques de l'activation des macrophages</i>	49
<i>Figure 8. Diversité de phénotype des macrophages dans l'inflammation</i>	52
<i>Figure 9. Les profils des macrophages pendant la régénération musculaire</i>	60
<i>Figure 10. Les exemples de sélénoprotéines présentes dans les thyrocytes</i>	63
<i>Figure 11. L'élément SECIS suit un consensus d'acide aminé et a une structure secondaire variable selon les différentes sélénoprotéines</i>	65
<i>Figure 12. Machinerie de la biosynthèse de la sélénoprotéine</i>	66
<i>Figure 13. Caractéristiques structurales des deux domaines de la sélénoprotéine P (Sepp1)</i>	70
<i>Figure 14. La glutathion peroxidase 3 agissant comme un antioxydant</i>	79

Introduction

1. Le muscle squelettique et les étapes de la myogenèse

1.1 Constitution générale du muscle squelettique et l'impact des nouveaux concepts

Le muscle squelettique est composé d'une série de fibres musculaires constituées de myofibrilles. Ces fibres, ou cellules musculaires, sont longues et multinucléées. Aux extrémités de chaque muscle squelettique, un tendon relie le muscle à l'os. Ce tendon se connecte directement à l'épimysium ou à l'enveloppe de collagène externe du muscle squelettique. Sous l'épimysium, les fibres musculaires sont regroupées en faisceaux appelés fascicules (Figure 1). Ces faisceaux sont entourés d'un autre revêtement protecteur en collagène. La disposition des fibres musculaires entre les tendons permet la transduction de force du muscle à l'os (Lieber and Friden, 2000). En plus des myofibrilles, le muscle squelettique contient également d'autres composants cellulaires qui soutiennent et régulent la fonction musculaire. Parmi ceux-ci se trouve le système vasculaire contenant les cellules endothéliales, les péricytes et les cellules sanguines (Bentzinger et al., 2012). Le système vasculaire assure un apport en nutriments et en oxygène tandis que les cellules du système immunitaire provenant du sang phagocytent les débris cellulaires et soutiennent la régénération musculaire après une lésion. Cette régulation sera détaillée plus tard. D'autres composants cellulaires qui contribuent à la biologie musculaire sont les fibroblastes (qui composent la matrice extracellulaire), la population de cellules souches (qui contribuent à la régénération musculaire) et les nerfs (qui sont essentiels à la contractilité musculaire) (Kuang and Rudnicki, 2008). Comme les muscles squelettiques sont composés principalement de matériel contractile, il n'est donc pas surprenant que la grande majorité des études sur le muscle squelettique se concentrent sur ses propriétés contractiles. Cependant, les éléments comme le tissu conjonctif et les vaisseaux sanguins peuvent fortement influencer la biologie musculaire.

La matrice extracellulaire musculaire (ECM) est subdivisée en tissus conjonctifs endomysial (autour de la cellule musculaire), pérимysial (autour des faisceaux de cellules musculaires) et épimysial (autour du muscle entier) (Eisenberg, 1983). Cependant, des travaux utilisant la microscopie électronique démontrent qu'un réseau d'ECM entoure les fibres musculaires de façon non linéaire, sans respecter cette subdivision (Trotter et al., 1992 ; Purslow et al., 1994). Ainsi, l'ensemble du réseau de la matrice extracellulaire acquiert une géométrie responsable du développement de la force. La discussion centrale de ce travail est basée sur le fait que cette nouvelle géométrie du réseau d'ECM soit plus importante à la transmission de la force que les propriétés constitutives des fibres de collagène, un composant de cette matrice. Cependant,

étant donné que plusieurs muscles n'ont pas été étudiés au même niveau de détail, il n'est pas clair si ce niveau d'organisation non linéaire est typique de tous les muscles.

Des nouveaux concepts concernant l'interaction cellulaire et le microenvironnement musculaire ont été également proposés. Le traitement avec différents composants de l'ECM a été étudié afin de comprendre son soutien à la réparation du tissu musculaire. En effet, il a été montré que l'injection intramusculaire d'un agent régénératif (RGTA), constitué de composants de l'ECM, comme les glycosaminoglycannes mimétiques, trois jours après une lésion a augmenté le nombre de noyaux et de capillaires dans les myofibres en régénération. Ceci indique que l'administration de RGTA stimule la myogenèse et l'angiogenèse, accélérant ainsi la régénération du muscle squelettique (Bouviere and Trignol et al., 2019). Dans ce contexte, une autre étude utilisant des modèles *in vitro* montre que les cellules endothéliales et les myoblastes peuvent interagir de manière paracrine (Christov et al., 2007). De plus, de façon très élégante, il a été démontré par notre équipe que le système angiopoïétine Ang/Tie, l'un des principaux systèmes moléculaires régulant l'homéostasie vasculaire, induit les cellules myogéniques vers l'état de cellule de réserve (*i.e.* quiescence) *in vitro* et qu'Ang1/Tie-2 est également exprimé par les cellules satellites quiescentes dans le muscle squelettique *in vivo* (Abou-Khalil et al., 2009). Ces analyses ont ainsi identifié un nouveau rôle du système Ang/Tie dans l'auto-renouvellement des cellules souches musculaires. Les capillaires sont également nécessaires pour le recrutement de cellules du système immunitaire au cours de la régénération musculaire. Le rôle de ces cellules sur l'homéostasie du muscle squelettique sera discuté dans les prochains chapitres. En plus des vaisseaux sanguins, les nerfs sont également nécessaires au muscle squelettique notamment grâce à leur fonction impliquée dans la contraction. Par exemple, pour qu'une fibre musculaire squelettique puisse se contracter, elle doit recevoir une impulsion d'une cellule nerveuse, un processus dépendant des nerfs. En outre, cette contraction musculaire provoquée par le système nerveux présente la capacité de modifier le profil métabolique musculaire.

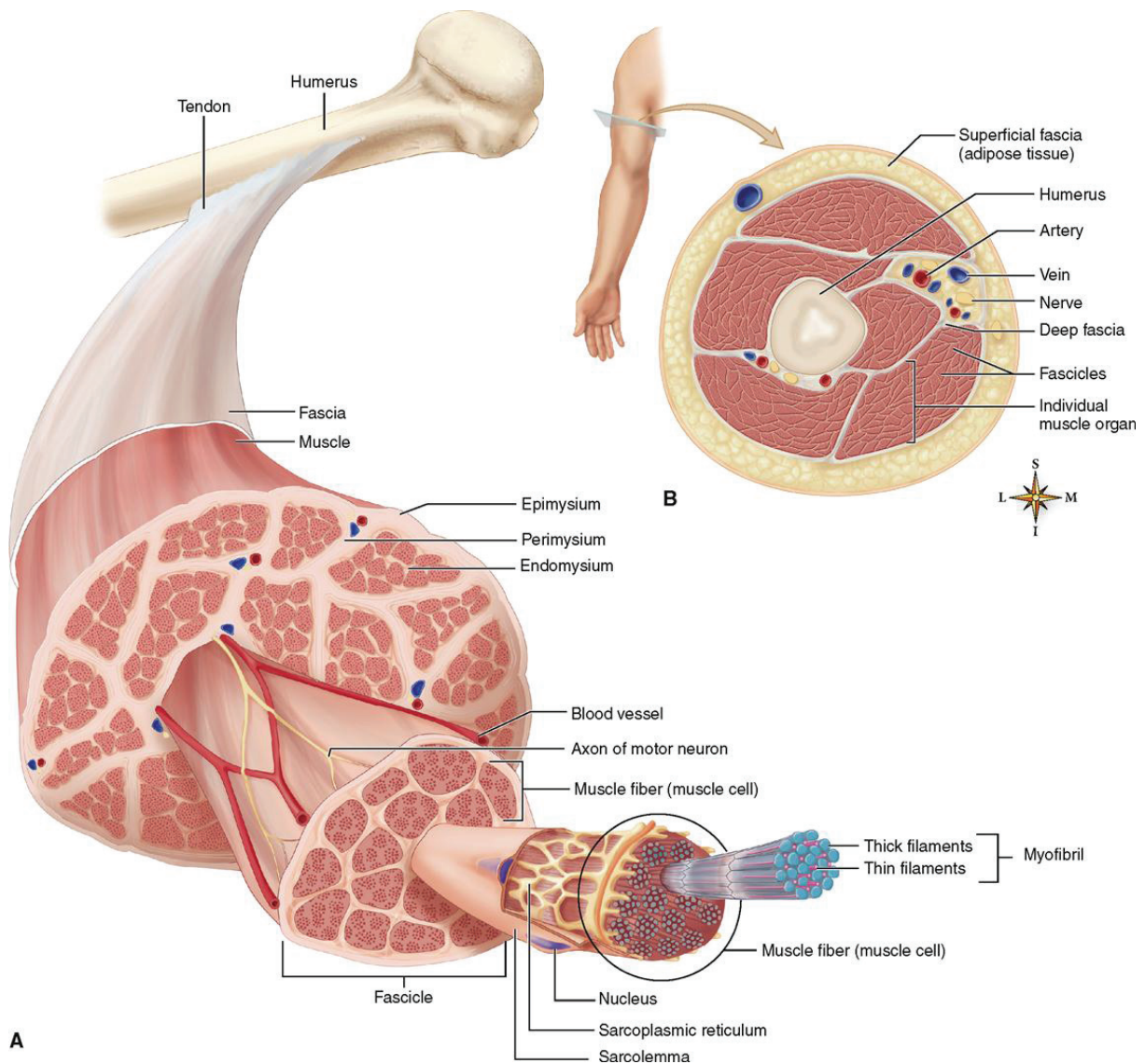


Figure 1 : Schéma illustrant les composants d'un muscle

- A.** Les revêtements du tissu conjonctif : l'épimysium, le périmysium et l'endomysium sont continus jusqu'au tendon. Les fibres musculaires sont maintenues ensemble par le périmysium dans des groupes appelés fascicules.
- B.** Le schéma montre le bras en coupe transversale. L'image illustre les relations entre les fascias superficiels et profonds et les muscles ainsi que d'autres structures du plan de coupe.

1.2 La composition des myofibres influençant les propriétés musculaires métaboliques

Chaque myofibre contient des myofibrilles composées de sarcomères en série, constitués d'actine et myosine qui interagissent entre elles pour réaliser la contractilité musculaire. Un composant majeur de la myosine est la chaîne lourde de la myosine (MyHC), avec des isoformes ayant différentes activités ATPase qui dictent les caractéristiques de contraction de la myofibre. En effet, le contenu en isoforme de MyHC est la base de la classification des myofibres à contraction lente (de type I), ou à contraction rapide (de type IIA, IIX ou IIB). Les myofibres utilisent également différentes stratégies métaboliques pour répondre à leurs besoins en ATP. Les types I et IIA utilisent le métabolisme oxydatif, étant riches en mitochondries et de taille réduite pour une diffusion efficace de nutriments à partir des nombreux capillaires qui les entourent. De plus, ces fibres ont un apport faible mais régulier en ATP par rapport aux fibres ayant un métabolisme principalement glycolytique, ce qui leur confère une résistance élevée à la fatigue. En revanche, les myofibres de type rapide IIB sont plus grosses et principalement glycolytiques. Elles peuvent rapidement produire des niveaux élevés d'ATP en utilisant des réserves de glycogène indépendantes de l'oxygène (Jensen and Dahl, 1995). L'inconvénient est que ces réserves s'épuisent rapidement et que cela entraîne la fatigue. Les myofibres oxydatives sont recrutées lors d'un effort de longue durée puisque la production d'ATP est stable, tandis que les fibres glycolytiques sont recrutées lors d'un effort de courte durée grâce à son activité d'ATPase élevée et par conséquent une production d'ATP plus rapide par rapport aux myofibres oxydatives (Figure 2) (Schiaffino et al., 2010).

Ainsi, les différents profils métaboliques, glycolytiques et oxydatifs, constituent la plasticité du muscle squelettique qui contribue à la régénération, l'hypertrophie et l'homéostasie musculaire. Cette contribution peut être par l'interaction avec des facteurs de régulation myogénique ou des molécules sécrétées, en agissant sur la fonction du muscle. Par exemple, il a été démontré, chez les souris adultes, que l'inactivation du gène du facteur de régulation myogénique 4 (MRF4) engendre des distributions similaires de myofibres de types I, IIA et IIB. Cependant, la force musculaire était réduite chez ces souris (Zhang et al., 1995). De plus, il a été démontré que le lactate, une molécule qui module l'expression protéique de MyoD, induit l'hypertrophie musculaire des myotubes *in vitro* (Tsukamoto et al., 2018).

Le muscle sécrète des molécules, appelées myokines, qui ont la capacité d'interagir avec ces facteurs de régulation myogénique. Les myokines sont des cytokines synthétisées et libérées par les myocytes lors de la contraction musculaire. Elles sont impliquées dans la régulation autocrine du métabolisme du muscle squelettique en modulant leur activité biologique et leur

fonction, en particulier dans la masse et la fonction musculaire. Parmi ces myokines, la myostatine, l'irisine, l'interleukine 6 (IL-6) et le BDNF (Brain-derived neurotrophic factor) régulent l'hypertrophie musculaire. Le mécanisme d'action est déjà bien documenté. Ces molécules inhibent la voie de signalisation mTOR (Han et al., 2013 ; Han et al., 2018), activent la signalisation d'IL-6 (Reza et al., 2017) et contrôlent l'activation de la voie de l'insuline, PI3K-Akt (Al-Khalili et al., 2006) ainsi que la voie de l'AMPK (Matthews et al., 2009). De plus, une autre étude démontre la capacité de l'isoforme alpha 1 de l'AMPK à limiter la croissance du muscle par inhibition de la voie mTOR médiée par la phosphorylation du facteur d'élongation eucaryote 2 (Mounier et al., 2009), soulignant l'importance de déterminer le mécanisme par lequel les molécules peuvent réguler les voies de signalisation de croissance cellulaire.

D'autres molécules sécrétées, comme les sélénoprotéines, peuvent également agir sur cette régulation hypertrophique. En effet, les niveaux génique et protéique de la sélénoprotéine W (SelW) sont augmentés lors de la différenciation des précurseurs myogéniques. L'analyse de la séquence du promoteur SelW a identifié un site de liaison pour MyoD appelé E1, suggérant que le gène SelW peut être activé par la liaison de MyoD à E1 au cours de la différenciation précoce des cellules musculaires (Noh et al., 2010). De plus, le sélénium, présent dans le milieu des myoblastes de poulet, augmente l'expression génique de Selw ainsi que celle de Myf-5, MRF4 et de la myogénine dans ces cellules. D'autre part, le sélénium est également impliqué dans la différenciation des précurseurs myogéniques, suggérant un lien entre sélénium, sélénoprotéines, MRFs et différenciation cellulaire (Wu et al., 2012).

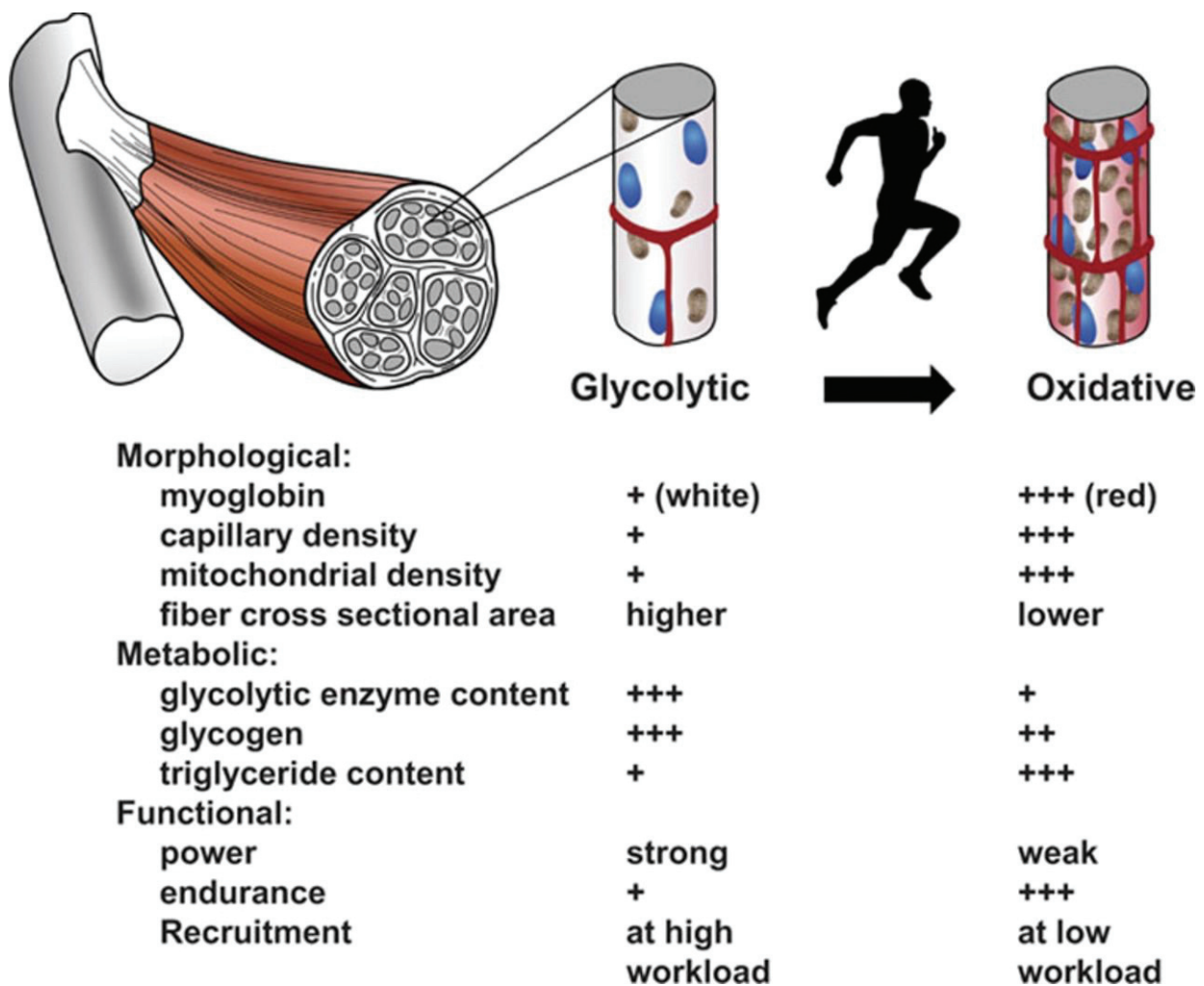


Figure 2 : Les différents types de fibres musculaires (Rowe et al., 2014)

Les fibres glycolytiques et oxydatives présentent un profil morphologique, métabolique et fonctionnel différents.

Les fibres glycolytiques contiennent des faibles quantités de myoglobine, densité capillaire et mitochondriale par rapport aux fibres oxydatives. Cependant, les fibres glycolytiques ont une aire augmentée. Concernant le profil métabolique, malgré la faible quantité de triglycérides, les fibres glycolytiques présentent une quantité d'enzymes glycolytiques et de glycogène plus important que les fibres oxydatives. Les fibres glycolytiques développent également plus de force par rapport aux fibres oxydatives. En revanche, elles sont peu recrutées pendant un effort long durée.

1.3 Les voies de signalisation impliquées dans la myogenèse

La fusion des cellules souches musculaires est un événement indispensable à la régénération des muscles squelettiques. De nombreuses protéines ont été impliquées dans la fusion des cellules musculaires (ou myoblastes). Cependant, le mécanisme grâce auquel la fusion des myoblastes est déclenchée et coordonnée dans le muscle fait l'objet de débat. Chez la souris, des expériences de perte de fonction de Myomaker et Minion - Myomerger ont révélé que ces protéines sont nécessaires à la fusion musculaire (Quinn et al., 2017). De plus, des cellules myosine positives mononucléées ont été détectées au cours du développement dans les deux souches de souris invalidées pour Myomarker ou pour Minion-Myomerger, indiquant que ces animaux présentent une capacité de différenciation et que la perte de ces gènes ne régule pas directement la différenciation, soulignant son importance sur la fusion (Zhang et al., 2017).

La voie mTOR est également essentielle au processus myogénique *in vivo* et *in vitro*. La rapamycine, une molécule qui inhibe mTOR est capable d'inhiber *in vitro* la différenciation des cellules musculaires ainsi que la régénération des muscles squelettiques (Pallafacchina et al., 2002 ; Ge et al., 2009), démontrant son importance dans la myogenèse. Pour démontrer le rôle spécifique de mTORC1, un mutant de mTOR résistant à la rapamycine (RR-mTOR) a été utilisé à la fois dans la lignée musculaire C2C12 et chez la souris. En présence de rapamycine, les cellules musculaires exprimant le mutant RR-mTOR étaient capables de se différencier et les muscles entiers se régénéraient normalement, indiquant que l'effet de la rapamycine était spécifique à sa capacité à inhiber mTOR (Erbay et al., 2001 ; Shu et al., 2002 ; Ge et al., 2009). La signalisation WNT/ β -caténine est également importante dans le processus de myogenèse. Cette signalisation contrôle diverses étapes de la myogenèse en régulant des molécules spécifiques. Il a été identifié qu'un blocage de la signalisation WNT/ β -caténine dans les cellules en prolifération diminue leur activité proliférative, sans induction de la mort cellulaire, par la régulation des gènes impliqués dans le cycle cellulaire (Ccna2 et Cdc25c). Pendant la différenciation musculaire, l'inhibition de la signalisation WNT/ β -caténine bloque la fusion des myoblastes par l'inhibition du gène homologue de la famille Fermitin 2 (Fermt2) (Suzuki et al., 2015). Le blocage de la signalisation WNT/ β -caténine dans les myofibres différenciées entraîne une altération du maintien de leur structure par le complexe cadhérine/ β -caténine/actine, qui joue un rôle crucial dans la connexion du cytosquelette d'une myofibre à la matrice extracellulaire. Ainsi, la signalisation WNT/ β -caténine régule la prolifération cellulaire, la fusion des myoblastes et leur homéostasie, en ciblant des molécules spécifiques.

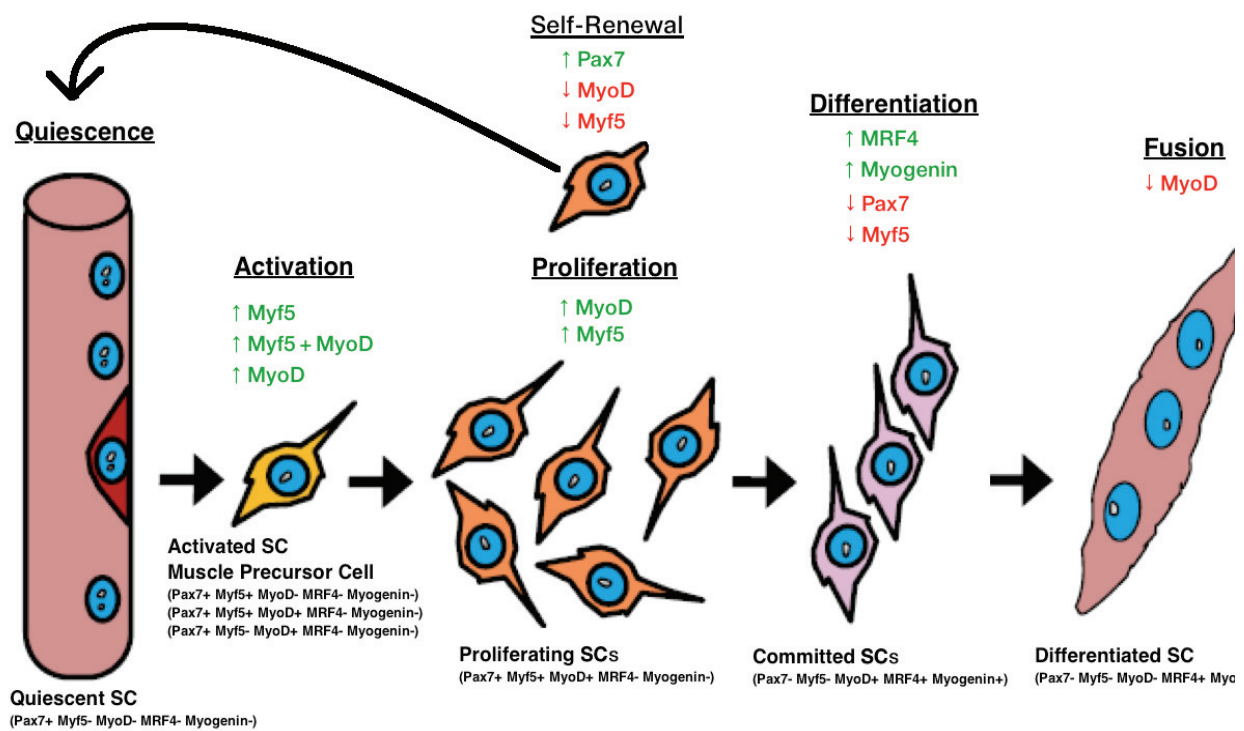


Figure 3 : Les étapes de la myogenèse (Séguin, 2014)

La progression des cellules satellites (SC) de la quiescence à la différenciation terminale. Les SC au repos expriment Pax7. Lors de l'activation, les SC expriment également Myf5/MyoD qui régulent leur prolifération. De plus, les précurseurs musculaires au cours de la prolifération peuvent conserver l'expression de Pax7 en régulant négativement Myf5/MyoD et en sortant du cycle cellulaire afin de retourner en quiescence. Ce processus est appelé auto-renouvellement. Dans le cas des cellules qui continuent le cycle de différenciation, elles expriment Myf5/MyoD, régulent négativement l'expression de Pax7 et positivement celles de MRF4/Myogénine. La différenciation terminale se produit lorsque les cellules myogéniques fusionnent pour former une nouvelle fibre musculaire.

2. La régénération musculaire et la réponse inflammatoire orchestrées par les macrophages

La myogenèse, le processus de génération du muscle squelettique, s'initie au cours du développement embryonnaire. Dans le muscle squelettique adulte, ce processus est présent à la suite d'une lésion. Dans le cas de la régénération musculaire, ce processus dépend de l'activation de cellules souches musculaires, appelées cellules satellites, susceptibles de se différencier en nouvelles fibres. Les cellules satellites sont activées, prolifèrent et fusionnent entre elles ou avec les fibres existantes pour réparer le tissu et rétablir l'homéostasie. Les cellules souches musculaires (MuSC), situées à l'extérieur du sarcolemme et à l'intérieur de la lame basale, peuvent être identifiées grâce à l'expression d'un certain nombre de marqueurs génétiques distinctifs tel que le facteur de transcription Pax-7. Une fois dans le cycle cellulaire, les MuSC expriment une série de facteurs de transcription spécifiques : les facteurs de régulation myogéniques (MRF), une classe de facteurs de transcription qui régulent la myogenèse post-natale. (Zhao et al., 2004). Les MuSC en expansion expriment Myf5 et MyoD (Relaix and Zammit et al., 2012), un déterminant fort de leur nature myogénique. Après la phase d'expansion, les MuSC quittent le cycle cellulaire et régulent négativement l'expression de Pax7 et de MyoD tout en augmentant celle de Myogénine, considérée comme un marqueur de différenciation myogénique terminale irréversible. Ensuite, les myocytes différenciés sont capables de fusionner ensemble et avec des fibres musculaires préexistantes pour reconstituer des myofibres fonctionnelles. Au moment de la fusion, les MuSC différenciées commencent à exprimer la machinerie sarcomérique des protéines nécessaires à la contraction. Avant de quitter le cycle cellulaire pour se différencier, un sous-ensemble de MuSC en expansion se renouvelle automatiquement en diminuant l'expression de MyoD et en augmentant celle de Pax7, revenant ainsi à un état de quiescence. L'équilibre entre l'auto-renouvellement symétrique et la division de ces cellules de façon asymétrique joue un rôle sur l'homéostasie musculaire (Feige et al., 2018). Il a été démontré que les divisions asymétriques de cellules souches sont régulées par la dystrophine et que ces divisions compromettent les étapes de la myogenèse (Dumont et al., 2015). Une molécule impliquée dans ce processus est la Wnt7a, agissant sur la voie de signalisation de la β -caténine qui active la transcription de gènes cibles (Dierick et Bejsovec, 1999). Wnt7a se lie au récepteur Frizzled7 et stimule la division symétrique des cellules satellites permettant ainsi l'augmentation du réservoir de ces cellules (Le Grand et al., 2009).

2.1 Le mécanisme de la régénération

Le muscle squelettique, chez les mammifères, a la capacité de se régénérer suite à diverses blessures, telles que les traumatismes mécaniques, le stress thermique, l'ischémie, les conditions pathogènes et les agents myotoxiques. Les agents myotoxiques sont capables de détruire l'intégrité de la membrane plasmique et de la lame basale de la myofibre, ce qui entraîne un afflux de calcium extracellulaire (Horn et al., 2017), la dégradation des protéines musculaires et enfin la nécrose (Gutiérrez et al., 1990). Cette première réponse à une lésion tissulaire caractérisée par la dégénérescence musculaire, induit l'activation d'une inflammation aiguë, qui est caractérisée cliniquement par le gonflement du muscle squelettique et la formation d'hématomes (Alessandrino et al., 2013). Cette inflammation aiguë présente deux étapes distinctes : la phase initiale intrinsèque et la phase de dégénérescence extrinsèque. La phase intrinsèque est la conséquence d'un envahissement du site lésé par des cellules sanguines (*i.e.* neutrophiles et macrophages) et se caractérise par une réponse tissulaire très rapide qui peut être observée dès les premières heures. L'augmentation du calcium intracellulaire induite par la lésion est responsable de l'inhibition de l'activité des mitochondries qui se désintègrent ainsi que d'autres organites comme le réticulum endoplasmique. Le calcium active également des enzymes protéolytiques qui dépolymérisent les microtubules. L'élévation des enzymes musculaires qui s'infiltrent dans la circulation est un paramètre biochimique indiquant une destruction musculaire. Puis, la phase de la dégénérescence extrinsèque est développée. Au cours de cette phase, en conséquence de la rupture des phospholipides membranaires, des éléments intracellulaires sont relargués. Par exemple, l'ADN, les débris extracellulaires, les protéines de choc thermique et les protéines associées à la chromatine HMGB1. Ces molécules sont appelées « *damage-associated molecular patterns* » (DAMPs) ou encore alarmines. Ces chémoattracteurs libérés sur le site de l'inflammation, stimulent les cellules du système immunitaire qui délivrent de l'histamine, de la sérotonine et des prostaglandines entraînant une importante dilatation et perméabilité des vaisseaux sanguins. La sécrétion de plusieurs cytokines comme le *tumor necrosis factor-alpha* (TNF- α), le *macrophage-inflammatory protein 2* (MIP-2) et le *cytokine-induced neutrophil chemoattractant* (CINC) permet le recrutement des monocytes et des neutrophiles circulants (Bentzinger et al., 2013 ; Soehnlein et al., 2010). Les macrophages sont également nécessaires à la réponse inflammatoire après une lésion musculaire (Chazaud et al., 2009). Ces cellules sont capables d'exprimer d'autres cytokines comme l'IL-1 β et IL10, afin d'obtenir un phénotype respectivement pro ou anti-

inflammatoire pour soutenir la prolifération et la fusion des précurseurs myogéniques (Arnold et al., 2007).

2.2 Les signaux de recrutement et d'activation des macrophages

Le processus inflammatoire est généralement bien orchestré, impliquant à la fois des signaux qui initient et maintiennent l'inflammation et des signaux qui arrêtent ce processus. Un déséquilibre entre les deux signaux laisse l'inflammation non contrôlée, entraînant des lésions cellulaires et tissulaires. Les macrophages sont des composants majeurs du système des phagocytes mononuclés, constitués des cellules d'origine médullaires, des monocytes sanguins et des macrophages tissulaires. Provenant du sang, les monocytes migrent dans divers tissus où ils se différencient en macrophages (Arnold et al., 2007 ; Theret et al., 2019). Au cours de l'inflammation, les macrophages présentent trois fonctions principales : la présentation antigénique aux cellules T, la phagocytose et l'immunomodulation par la production de diverses cytokines et facteurs de croissance comme les interleukines et l'IGF1 (Fujiwara et al., 2005). Pendant ce processus, les macrophages acquièrent différents phénotypes nécessaires à la résolution de l'inflammation. Les signaux d'activation de ces phénotypes comprennent par exemple les cytokines, les lipopolysaccharides bactériens et les protéines de la matrice extracellulaire. Étant donné que les macrophages produisent un large nombre de molécules qui ont des effets biologiques sur l'inflammation, les interventions thérapeutiques ciblant les macrophages et leurs produits peuvent ouvrir de nouvelles voies pour contrôler les maladies inflammatoires. Il est donc essentiel de comprendre de façon détaillée leur recrutement et action dans l'inflammation tissulaire. Afin de clarifier les différents stimulus et leur influence sur la biologie des macrophages il est possible de les catégoriser en deux classes : « *Danger signals* » (DS) ou « *homeostatic, metabolic and modulatory signals* » (HMMS).

Les DS incluent les composants microbiens tels que les agents pathogènes comme le LPS qui atteint des sites intracellulaires où ils ne sont pas normalement présents (*i.e.* l'ADN de virus dans le cytoplasme des cellules infectées) et aussi des molécules endogènes dont la présence à des niveaux élevés dans le milieu extracellulaire dénote une perte locale de l'intégrité cellulaire ou tissulaire. Le site cellulaire de détection initiale d'un signal de danger spécifique varie, ce qui reflète différentes voies d'entrée du pathogène et, par conséquent différents récepteurs de reconnaissance. Alors que les récepteurs Toll-like (TLR) transmembranaires peuvent être associés à la surface de la cellule (*i.e.* TLR4) ou aux endosomes (*i.e.* TLR3, détectant l'ARN après absorption du virus dans les phagosomes), un panel de capteurs comprenant l'hélicase

RIG-I et la GMP-AMP synthase cyclique (cGAS) spécifique de l'ADN détecte la présence anormale de ces acides nucléiques dans le cytoplasme, afin de stimuler la réponse des macrophages.

Les signaux de danger endogènes sont collectivement signalés par des alarmines comme la protéine de chromatine HMGB1 ainsi que l'ATP extracellulaire, qui sont activement libérés pendant une lésion stérile et déterminent des réponses inflammatoires (Sowinska et al., 2019). L'exposition de macrophages à des signaux de danger endogènes doit être considérée comme un événement exceptionnel déclenchant une intervention d'urgence visant à éliminer les envahisseurs, à réparer les tissus et à restaurer l'homéostasie.

Une situation conceptuellement très différente est la stimulation des macrophages par une large gamme de HMMS. L'exposition des macrophages à ces stimulus a une incidence sur leur capacité à réagir aux signaux de danger. Un exemple peut être fourni par la réponse aux corps apoptotiques : bien que leur ingestion par des monocytes recrutés dans un environnement entraîne une inflammation supplémentaire, leur ingestion par les macrophages tissulaires est généralement immunologiquement silencieuse. La réponse aux HMMS est large et comprend : a) les métabolites et les nutriments des cytokines immunomodulatrices, b) les corps apoptotiques et c) les signaux mécaniques (Figure 3).

En ce qui concerne les cytokines immunomodulatrices, certaines jouent un rôle important et bien caractérisé dans la biologie des macrophages. L'IL-4 et l'IL-13 par exemple modulent la fonction des macrophages dans les tissus, notamment le tissu adipeux, où ils contrôlent l'inflammation en stimulant la production de catécholamines par exemple (Qiu et al., 2014). De plus, la pré-exposition à l'IL-4 module la capacité des macrophages à réagir à une infection induite par un agent pathogène *via* la sécrétion d'autres molécules comme FIZZ1/RELMA (Loke et al., 2002), offrant ainsi un exemple paradigmatique de la manière dont le conditionnement tissulaire peut réguler les réponses générées par la reconnaissance des « signaux de danger ». Parmi les stimulus métaboliques et les nutriments contrôlant la biologie des macrophages, l'hème libéré lors de l'élimination des érythrocytes déclenche la formation d'un phénotype de macrophages spécialisé *via* l'induction du facteur de transcription SPI-C (Haldar et al., 2014), tandis que l'acide rétinoïque favorise la production de macrophages péritonéaux *via* l'induction du facteur de transcription GATA6. Les acides gras peuvent également moduler l'activation des macrophages dans l'obésité, médié par l'IL-4 (Rosas et al., 2014 ; Chawla et al., 2011). Le lactate est un autre exemple d'un métabolite produit localement, capable d'induire l'expression de certains gènes dans les macrophages essentiels à la croissance tumorale. De plus, le succinate produit lors de l'activation des macrophages par le LPS, stabilise

le facteur induit par l'hypoxie HIF1 α augmentant ainsi la production d'IL-1 β (Tannahill et al., 2013), soulignant l'importance de ces molécules pour la régulation de gènes dans les macrophages.

Une autre réponse à HMMS sont les corps apoptotiques normalement générés pendant les processus de développement et de remodelage des tissus. Ils sont reconnus par des récepteurs exprimés par les macrophages recrutés en réponse à ces signaux et présentent également un potentiel d'activation des macrophages selon leur état préexistant (Hochreiter and Ravichandran, 2013 ; Taylor et al., 2005). L'étirement mécanique cellulaire, induit par des biomatériaux constitués de matrice extracellulaire dans les tissus affecte également la fonction des macrophages, favorisant un programme d'expression génique analogue au phénotype M2, ainsi que la sécrétion réduite de cytokines inflammatoires (MacWhorter et al., 2013).

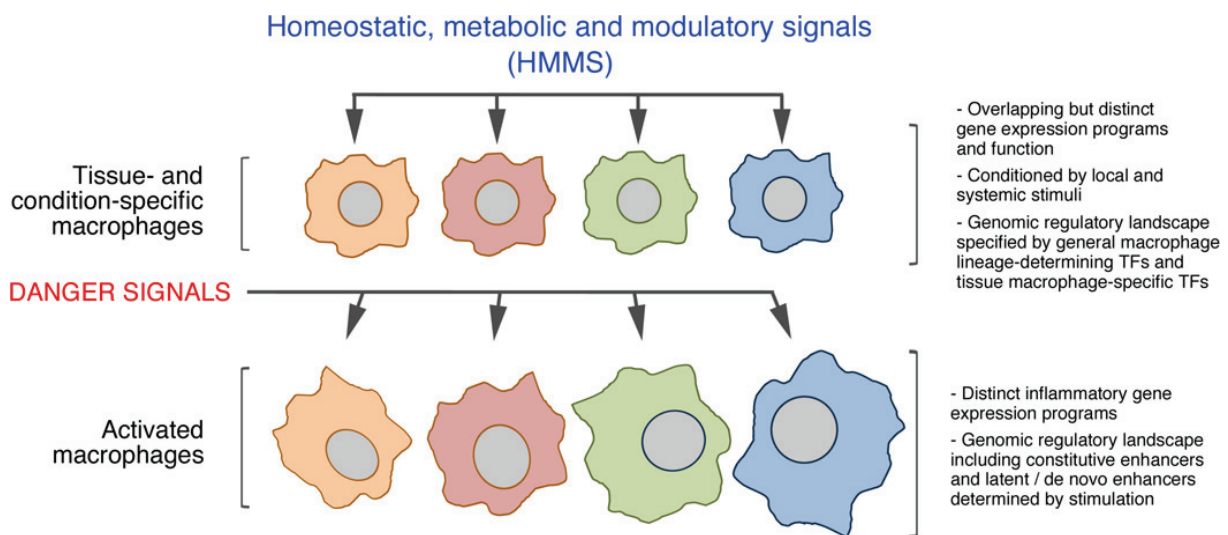


Figure 4 : Les différents stimulus d'activation de macrophages

(Glass and Natoli, 2016)

L'interaction entre les signaux homéostatiques du tissu et les signaux de danger dans le contrôle de la fonction des macrophages. Les macrophages tissulaires sont exposés à des signaux, provenant du microenvironnement, qui activent ou répriment leurs programmes d'expression génique ainsi que leur fonction, ce qui entraîne l'expression de gènes inflammatoires dans différents tissus. *TF = facteur de transcription.

Ces signaux peuvent déclencher l'activation sélective d'un nombre limité de voies de signalisation et de facteurs de transcription distincts, notamment les membres de la superfamille des récepteurs nucléaires. Plusieurs membres de cette famille, y compris le récepteur aux glucocorticoïdes et le récepteur- γ activé par les peroxyosomes (PPAR γ), fonctionnent comme des facteurs de régulation qui suppriment les activités de transcription NF- κ B et d'autres facteurs de transcription pro-inflammatoires par des mécanismes directs et indirects (Glass and Saijo, 2010 ; Uhlenhaut et al., 2013). Des études récentes indiquent qu'il est également probable que plusieurs récepteurs puissent être activés simultanément dans un type de cellule particulier, permettant des schémas de régulation plus complexes (Rosas et al., 2014 ; Okabe and Medzhitov, 2014 ; Gosselin et al., 2014). En effet, par exemple, il a été montré que dans le cas du gène codant pour iNOS, sa répression synergique est régulée par les agonistes du récepteur des glucocorticoïdes et du PPAR γ (Figure 4). Cette régulation est médiée par NF- κ B et NCoR (Ogawa et al., 2005 ; Pascual et al., 2005). Ensemble, ces observations indiquent que des combinaisons de récepteurs nucléaires pourraient servir à intégrer des voies de signalisation locales et systémiques impliquées dans le changement de phénotype des macrophages.

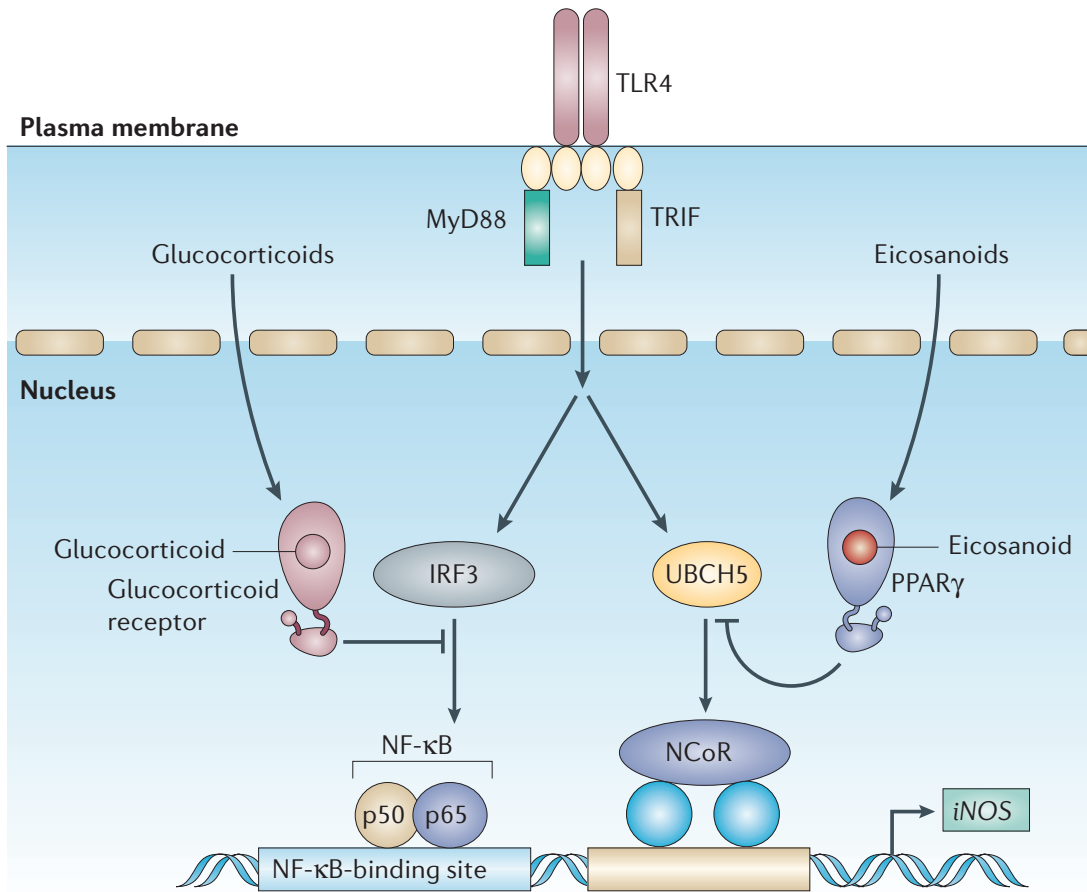


Figure 5 : Répression de la transcription génique du profil pro-inflammatoire de macrophages médié par le récepteur aux glucocorticoïdes et PPAR γ
(Glass and Ogawa, 2006)

Les récepteurs aux glucocorticoïdes exprimés de manière constitutive régulent l'expression des gènes en réponse aux hormones circulantes. Le PPAR γ a une expression inductible et ses activités de transcription sont régulées par les métabolites intracellulaires produits localement, comme les éicosanoïdes. En agissant par des mécanismes distincts qui convergent sur des gènes cibles, le récepteur aux glucocorticoïdes et le PPAR γ peuvent fonctionner de manière synergique pour réprimer les réponses inflammatoires, modulant le changement de phénotype des macrophages.

2.2.1 Les cytokines

Parmi les nombreuses cytokines produites par les macrophages au cours de l'inflammation, capables de les activer en pro-inflammatoires ou anti-inflammatoires, l'interféron gamma (IFN- γ) et l'interleukine 10 (IL10) sont deux des plus étudiées grâce à leurs effets modulateurs sur ces cellules.

2.2.2 Le paradigme du profil inflammatoire médié par l'IFN- γ et l'IL10

L'IFN- γ en tant que cytokine agit en association avec d'autres cytokines présentes dans le microenvironnement local. L'effet combinatoire entre l'IFN- γ et d'autres cytokines joue probablement un rôle dans le résultat final de la stimulation par l'IFN- γ . En effet, il a été démontré que l'IFN- γ et le TNF- α agissent en synergie dans l'augmentation d'expression d'iNOS dans les macrophages. Salim et collaborateurs ont disséqué les rôles de chaque cytokine et montrent que le TNF- α est responsable de l'induction rapide d'iNOS, alors que l'IFN- γ régule la production de l'oxyde nitrique (NO) en modulant les concentrations de ce produit (Salim et al., 2016). Dans ce contexte, l'IFN- γ induit dans les macrophages non seulement la production de NO mais aussi des chimiokines comme CCL-3, par l'activation du facteur de transcription STAT1 (Wang et al., 2018). Lors de la fixation de l'IFN- γ à son récepteur, la phosphorylation de JAK1 et de JAK2 est activée, ainsi que la phosphorylation du site de fixation de la molécule STAT1 sur la chaîne IFN- γ R1 (Figure 7). Cette fixation entraîne la phosphorylation de la molécule STAT1 qui s'homodimérise et traverse la paroi nucléaire pour se fixer sur les sites GAS (*IFN- γ activation sequence*) permettant la régulation de l'expression de nombreux gènes cibles qui régulent les effets biologiques médiés par STAT1. Parmi ses gènes cibles, sont présents p53 et p21, BCL6 (B cell lymphoma 6) ou STAT1 lui-même ce qui permet une amplification de ses effets biologiques (Ramana et al., 2000; Saha et al., 2010). Une étude a démontré que les gènes induits par STAT1 sont capables de médier les effets inhibiteurs de l'IFN- γ sur la migration des macrophages et que cet effet inhibiteur est complètement abrogé chez les macrophages déficients pour *Stat1*. De plus, une autre étude a démontré que *Stat3* est nécessaire pour maintenir la motilité de macrophages, confirmant les hypothèses sur l'interaction entre IFN- γ et la voie des STATs (Dallagi et al., 2015). Cependant, de façon paradoxale, cette même voie de signalisation peut également moduler un autre phénotype de macrophage (Figure 5). C'est le cas une fois que l'interleukine 10 se lie à son récepteur. L'autophosphorylation conduira à l'activation du facteur de transcription STAT3 et sa liaison

induira une inhibition de l'expression des cytokines pro-inflammatoires afin d'activer la machinerie génique anti-inflammatoire (Niemand et al., 2003). Le profil génique de macrophages activés par l'IL-10 pendant 2 ou 7 jours *in vitro* a été analysé et comprend plusieurs récepteurs comme les récepteurs de reconnaissance *formyl peptide receptor 1* (FMLP), *Toll-like receptor 1* (TLR1), *Toll-like receptor 8* (TLR8) et *macrophage receptor with collagenous structure* (MARCO) ; les récepteurs de cytokines *Interleukin 21 receptor* (IL-21R), *Interleukin 2 receptor, alpha* (IL-2RA) ; les récepteurs de chimiokines *Chemokine (C-X3-C) receptor 1* (CX₃CR1) (Park-Min et al., 2005). Malgré les résultats de régulation transcriptionnelle de gènes, d'autres études démontrent que le traitement avec IL10 pendant 5 jours ou 16 heures est aussi capable d'augmenter l'expression protéique du récepteur appelé *Hemoglobin-haptoglobin scavenger receptor* (CD163) dans les macrophages (Porcheray et al., 2005 ; Tran et al., 2015), suggérant que la régulation de CD163 dans les macrophages est indépendante du temps d'administration d'IL10. Cependant, il a été démontré que l'expression génique du *CD163* a été indétectable après 8h d'administration. Cela suggère que l'induction de CD163 par l'IL-10 est due, à la régulation post-transcriptionnelle caractérisée par une augmentation d'ARN et une synthèse de protéines (Sulahian et al., 2000), soulignant le fait que les niveaux protéiques sont plus fiables pendant l'évaluation de populations de macrophages. De façon intéressante, il a été montré que les macrophages qui expriment CD163 ont également exprimé CD206 (Zeyda et al., 2007 ; Tang et al., 2013 ; Shaul et al., 2010). De plus, ils sécrètent de l'IL10, antagonistes du récepteur de l'IL-1, producteurs de la *chemokine ligand 18* (CCL18) et présentent une grande capacité de phagocyter les cellules apoptotiques (Zizzo et al., 2012). Comme l'expression de CD163 n'est pas limitée aux macrophages anti-inflammatoires, il ne doit pas être utilisé comme seul marqueur pour identifier cette population de macrophages (Barros et al., 2013), suggérant l'emploi de ces deux marqueurs (CD163 et CD206) afin de caractériser le statut anti-inflammatoire des macrophages de façon robuste. L'ensemble de ces résultats démontre que les cytokines en question peuvent réguler le profil des macrophages afin d'acquérir un phénotype pro ou anti-inflammatoire. Cependant, grâce à leur plasticité cellulaire les macrophages peuvent obtenir d'autres profils métaboliques induits par différentes voies de signalisation cellulaires au cours de l'inflammation.

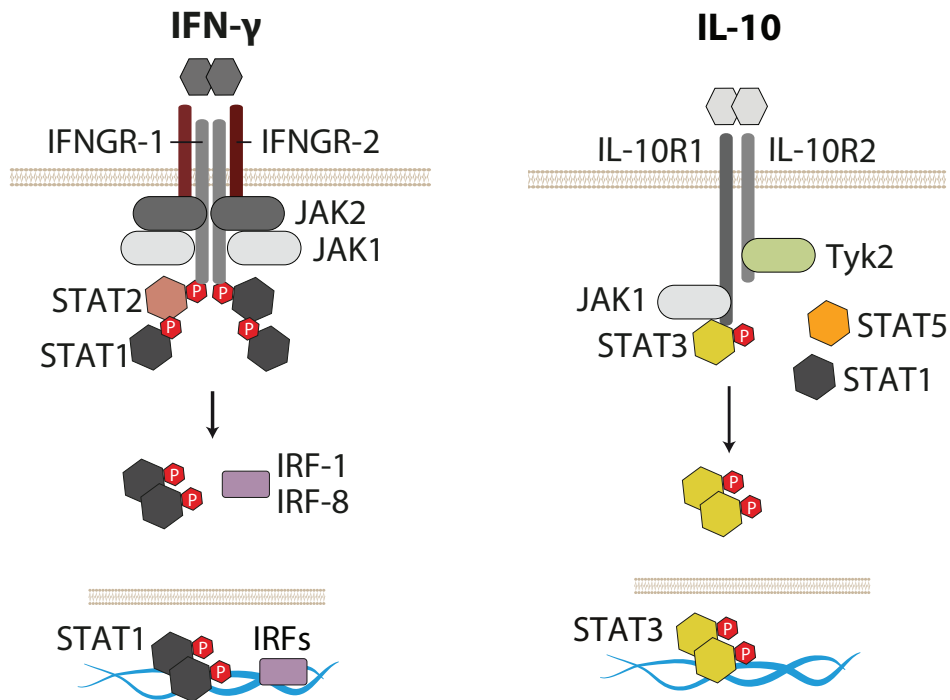


Figure 6 : Les profils pro et anti-inflammatoires des macrophages médiés par l'IFN- γ ou l'IL10

IFN- γ : La liaison de l'IFN- γ à son récepteur qui se dimérise à IFGNR-1 et à IFGNR-2. Les JAK s'autophosphorylent puis phosphorylent le domaine cytoplasmique de l'IFNGR1 provoquant la formation et la phosphorylation du dimère STAT1 α . Le dimère STAT1 α se dissocie du récepteur et forme un homodimère pour une translocation nucléaire *via* les IRFs pour l'activation de gènes spécifiques.

IL10 : L'IL10 se lie à son récepteur que se dimérise à IL10R1 et à IL10R2. Le récepteur associé à JAK1 phosphoryle STAT3, qui se dimérise puis transloque dans le noyau pour stimuler la transcription des gènes.

2.3 Les différents phénotypes de macrophages dans le processus inflammatoire

Les macrophages, une population hétérogène de cellules immunitaires, possèdent des fonctions spécifiques dans les réponses à l'inflammation selon les différents phénotypes. Ces profils dépendent de la plasticité de ces cellules spécialisées dans la détection des signaux, provenant du microenvironnement, qui modifient leurs propriétés. Bien qu'il soit clair que les phénotypes de macrophages sont difficiles à classer due aux nombreuses voies de signalisation utilisées pour chacun d'entre eux, ils peuvent être simplifiés en deux extrêmes : un profil pro-inflammatoire et un profil anti-inflammatoire.

2.3.1 Macrophages pro inflammatoires (M1) et anti-inflammatoires (M2)

Basé sur cette définition, les macrophages M1 sont capables de déclencher et de maintenir des réponses inflammatoires, en sécrétant des cytokines pro-inflammatoires, en phagocytant les cellules apoptotiques et en induisant le recrutement d'autres cellules immunitaires dans le tissu enflammé. D'autre part, les macrophages M2 favorisent la résolution de l'inflammation, stimulent le dépôt de collagène et libèrent des médiateurs anti-inflammatoires. Le métabolisme cellulaire accompagne ces changements phénotypiques et fonctionnels des macrophages.

En particulier, les macrophages M1 utilisent principalement la glycolyse (Hard et al., 1970 ; Fukuzumi et al., 1996) et présentent des particularités pour le métabolisme du cycle de Krebs qui entraînent une accumulation d'itaconate (un composé microbicide) et de succinate (Meiser et al., 2016). L'excès de succinate conduit à la stabilisation du facteur induit par l'hypoxie (HIF1 α) qui active la transcription des gènes glycolytiques, maintient ainsi le métabolisme glycolytique des macrophages M1 (Tannahill et al., 2013 ; Jha et al., 2015 ; Galvan-Pena et O'Neill, 2014). D'autres études démontrent également que les macrophages pro-inflammatoires utilisent la glycolyse et la voie du pentose phosphate (PPP) qui est présent dans le cytosol et comprend deux phases distinctes (Baardman et al., 2018). Dans la phase oxydative, l'énergie issue de la conversion métabolique du glucose-6-phosphate en ribulose-5-phosphate est utilisée pour la réduction de NADP⁺ en NADPH. Le NADPH est ensuite utilisé par plusieurs enzymes dont la NADPH oxydase, qui génère des espèces réactives de l'oxygène (ROS), pour phagocyter les agents pathogènes. De plus, les niveaux élevés de NADPH offrent une protection contre le stress oxydatif, en fournissant un pouvoir réducteur par la production de l'antioxydant glutathion. Cependant, cette affirmation est encore objet de débat alors qu'une récente étude *in vivo* démontre que les macrophages ne produisent pas de ROS après l'inflammation musculaire

induite par une lésion stérile. De plus, les profils d'expression des gènes impliqués dans la réponse au stress oxydatif dans ces cellules n'indiquent aucune réponse antioxydante (Le Moal et al., 2018).

Les cellules M2 sont dépendantes de la phosphorylation oxydative (OXPHOS), source des substrats pour les complexes de la chaîne de transport d'électrons (ETC) qui est le moyen principal de génération d'ATP. De plus, les macrophages pro et anti-inflammatoires sont caractérisés par des voies spécifiques qui régulent le métabolisme des lipides et des acides aminés et modifient leurs réponses. Toutes ces adaptations métaboliques sont fonctionnelles pour soutenir les activités des macrophages et pour maintenir leur polarisation dans des contextes spécifiques. De nouvelles informations sur la régulation des macrophages ont été découvertes par Van den Bossche et collaborateurs (Van den Bossche et al., 2016). Dans cette étude, il a été observé qu'une fois que le macrophage s'engage à devenir M1, il ne peut pas être reprogrammé pour devenir M2 en réponse à l'IL4. Cependant, l'inverse ne serait pas vrai : le M2 peut être converti en un M1 par l'ajout de LPS. La reprogrammation métabolique de la fonction des macrophages pourrait avoir un impact sur la manipulation thérapeutique des macrophages dans une inflammation tissulaire. En effet, l'inhibition de la SDH ou de l'enzyme PKM2 peuvent promouvoir un phénotype M2 en réponse au LPS (Palsson-McDermott et al., 2015). L'AMPK est une autre molécule du métabolisme cellulaire qui peut réguler la transition du phénotype pro vers anti-inflammatoire *in vivo* (Mounier et al., 2013).

Les macrophages anti-inflammatoires M2 sont également divisés en 3 sous-ensembles : M2a, M2b et M2c basés sur des profils d'expression génique *in vitro* (Martinez and Gordon, 2014 ; Martinez et al, 2008 ; Mantovani et al., 2004). Le sous-type M2a est induit par l'IL-4 et l'IL-13. Ces deux cytokines peuvent réguler négativement l'expression des médiateurs pro-inflammatoires de macrophages tels que la production d'IL-1 β , de TNF- α , d'IL-6, d'IL-12 et d'IFN- γ . De plus, des études *in vitro* ont indiqué que l'IL-4/l'IL-13 pouvait également réguler les molécules du MHC-II, les intégrines bêta 2 et le MMP-1 et que les cellules M2a expriment également des protéines qui favorisent la fibrogenèse, la réparation des tissus et la prolifération (Novak et al., 2013 ; Chizzolini et al., 2000 ; Gratchev et al., 2001). D'autre part, le profil M2b est induit par le ligand d'IL-1R ou par l'exposition au LPS. Les M2b sont caractérisés par une faible production d'IL-12 et d'IL-10, un profil de cytokines qui favorise la réponse immunitaire Th2 (Anderson et al., 2002). Le sous-type M2c est induit par l'IL-10, le TGF- β ou les glucocorticoïdes et se caractérise par une réduction d'expression des cytokines pro-inflammatoires et une activité accrue de piégeage des débris. Wang et collaborateurs ont décrit un autre sous-type de M2 à savoir, le macrophage M2d, caractérisé par une faible production

d'IL-12 et une forte production d'IL-10 présentant certaines caractéristiques des macrophages associés aux tumeurs (TAM) (Wang et al., 2010). Dans ce contexte, une récente étude de l'équipe de Ido Amit a également décrit une nouvelle population de macrophages anti-inflammatoires présentes dans l'inflammation induite par l'obésité. Ces macrophages utilisent Trem2 pour le retour à l'homéostasie du tissu. L'absence de ce récepteur conduit à l'hypertrophie des adipocytes ainsi qu'à une hypercholestérolémie systémique, une accumulation de graisse corporelle et une intolérance au glucose (Jaitin et al., 2019).

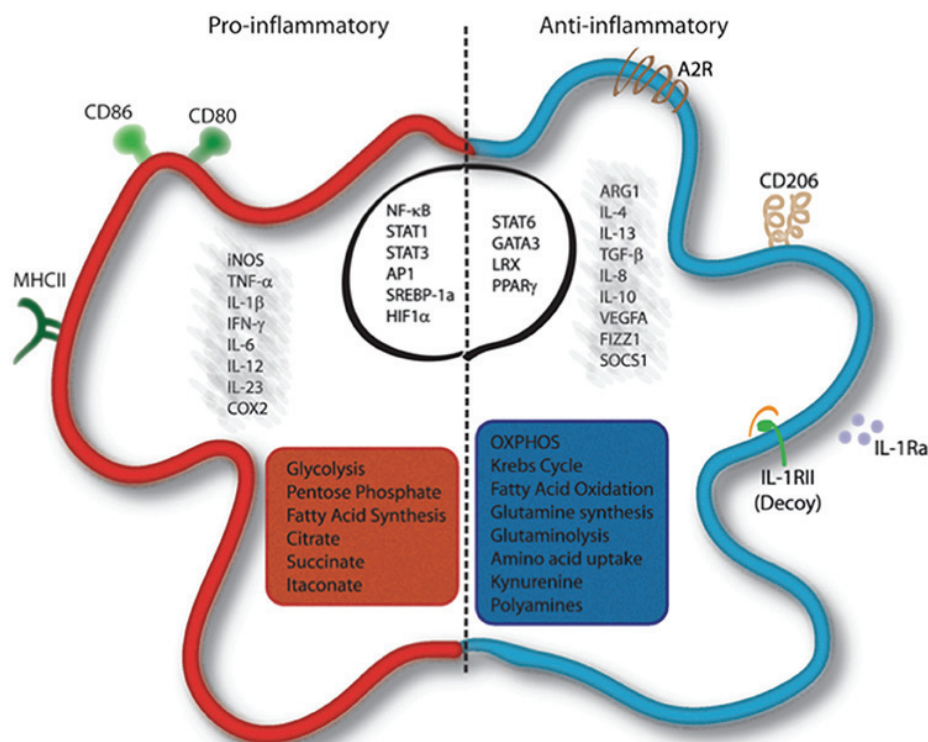


Figure 7 : Signatures moléculaires et métaboliques de l'activation des macrophages

Les macrophages pro-inflammatoires induisent l'activation de voies spécifiques par l'activation de facteurs de transcription tels que NF- κ B, STAT1, STAT3, AP-1, SREBP-1 et HIF1 α , qui déclenchent l'expression de marqueurs tels que iNOS, COX-2, CD80, CD86 et MHC-II et la libération d'IL-1 β , TNF- α , IFN- γ , IL-6, IL-12 et IL-23. Les cellules sont soumises à une reprogrammation métabolique vers la glycolyse, la voie du pentose-phosphate et la synthèse des acides gras. L'itaconate est produit à partir de citrate et présente une fonction antibactérienne. Les macrophages anti-inflammatoires sont caractérisés par l'expression

d'ARG1, de FIZZ1, de SOCS1, de CD206, de récepteurs de l'adénosine (A2R), IL1RII et par la production de cytokines telles que TGF- β , IL-10, IL-4, IL-13, IL-8 et VEGFA. Leur profil est principalement contrôlé par l'activité des facteurs de transcription STAT6, GATA3, PPAR γ et LRX. Ces cellules présentent un métabolisme centré sur la phosphorylation oxydative (OXPHOS), l'oxydation des acides gras et la glutaminolyse, qui génère le catabolisme du tryptophane avec libération de kynurénine et une synthèse de polyamines (Viola et al., 2019).

2.3.2 Macrophages Mox (M-ox)

Récemment, une nouvelle population de macrophages a été décrite. La découverte a permis de conclure que les phospholipides oxydés sont des inducteurs d'un nouveau phénotype de macrophages, les M-ox, dont la polarisation est médiée par le facteur de transcription Nrf2 (Kadl et al., 2010). En absence de Nrf2, les macrophages ont une régulation du statut redox compromise, indiquant que ce phénotype dispose d'un pouvoir anti-oxydant important. De plus, il a été constaté que les macrophages M-ox représentent 30% de tous les macrophages dans les lésions athérosclérotiques avancées, suggérant une spécificité de cette population lors des maladies inflammatoires. D'autre part, les M-ox présentent de faibles capacités de chimiotactisme et de phagocytose et sont générés *in vitro* à partir des macrophages M1 et M2 différenciés avec le stimulus des cytokines comme l'IFN γ , ajoutant une preuve supplémentaire de la plasticité des macrophages dans l'inflammation.

2.3.3 Macrophages associés à l'hémorragie (M-ha)

Les macrophages associés aux hémorragies (M-ha) ont été récemment proposés (Boyle et al., 2009 ; Boyle et al., 2011) et semblent être liés aux macrophages M-ox. Les monocytes humains peuvent être différenciés *in vitro* en macrophages M-ha en utilisant le complexe hémoglobine/haptoglobine (Hb/Hp) ou des globules rouges oxydés, ce qui conduit à la régulation de CD163, HO-1 et IL-10 de manière dépendante de Nrf2. Ces sous-types de macrophages résistent à l'accumulation lipidique et régulent le contenu intracellulaire en lipides *via* l'induction de transporteurs impliqués dans l'efflux de cholestérol (Finn et al, 2012). Les M-ha constituent la première ligne de défense contre les dommages induits par les érythrocytes sénescents et le fer et présentent ainsi un effet athéroprotecteur.

2.3.4 Macrophages dérivés de la chimiokine 3 (M-DC)

La population des macrophages dérivés de la chimiokine 3 (M-DC), a été identifiée en 1997. Cette cytokine est synthétisée tardivement dans le processus de différenciation des macrophages et des niveaux importants de l'expression ne s'observe qu'après 6 jours de différenciation de ces cellules (Godiska et al., 1997). Ce mode d'expression contraste avec la plupart des autres chimiokines, comme MCP-1 qui sont rapidement induites après une inflammation (Chantry et al., 1998). La fonction chemoattractante de M-DC sur le recrutement de cellules Th2 a été également démontré. M-DC se lie à CCR4, qui est exprimé par les cellules Th2 (Imai et al., 1998 ; Imai et al., 1999). Ensuite, les cellules T produisent principalement des cytokines IL-4 et IL-5 (Imai et al., 1999). Les résultats de cette étude corroborent la conclusion formulée par Gonzalo et al. (1999) et Vestergaard et al. (1999) où il a été démontré que les M-DC étaient impliqués dans l'inflammation des voies respiratoires allergiques médié par les lymphocytes T. De plus, il a été également rapporté le recrutement des lymphocytes T CD3 et CD4 positifs dans le thymus, grâce à la présence abondante des cellules épithéliales où cette nouvelle population est fortement exprimée (Chantry et al., 1999). Ainsi, la plupart des études menées à ce jour ont porté sur l'implication du M-DC dans la migration des autres cellules immunitaires notamment des lymphocytes. Cependant, des modèles d'études *in vitro* et *in vivo* ont permis de conclure que les M-DC attirent également les monocytes (Gonzalo et al. 1999 ; Godiska et al., 1997). Le fait que le recrutement et l'activation de monocytes dans des foyers infectieux soient capables d'agir sur l'élimination des bactéries (Aderem et al., 1999) suggère que les M-DC pourraient jouer un rôle crucial dans l'immunité innée lors d'autres infections comme le sepsis. En outre, les expressions de l'ARNm et des protéines pour le M-DC à partir de monocytes en culture ont été induites par IL-4 et IL-13 (Andrew et al., 1998). L'IL-4 et l'IL-13 sont connus pour exercer des effets bénéfiques dans les modèles expérimentaux de sepsis *via* une modulation de la production de cytokines/chimiokines inflammatoires (Baumhofer et al., 1998 ; Muchamuel et al., 1997). Ainsi, il est suggéré que la chimiokine CX3C inducible par l'IL-4 et l'IL-13 exprimés par les M-DC pourraient contribuer à l'immunité innée, par le recrutement de monocytes et de lymphocytes T au cours des inflammations sévères et des infections.

2.3.5 Macrophages anti-athérogéniques (M4)

Les macrophages dépendant de CSF/CXCL4, découverts en 2010 par Gleissner et collaborateurs ont été appelés M4 (Gleissner et al., 2010). Il a été démontré que ces macrophages se caractérisent par un profil de transcrits mixtes, mais unique, comprenant des augmentations de l'expression de CD86 et de TNF- α (analogues à M1), CD206, CCL18 et CCL20 (analogues à M2) et des niveaux inférieurs de pentraxine 3 (PTX3), CD36 et IL-10 (type M2). Bien que ces cellules aient une faible activité phagocytaire, la fonction des macrophages M4 reste mal comprise.

Jusqu'à ce jour, les phénotypes de macrophages discutés n'ont pas été détectés dans un cadre d'inflammation stérile en réponse à une lésion musculaire *in vivo*. Dans ce contexte, l'objectif du prochain chapitre est d'aborder les principaux rôles de macrophages au cours de l'inflammation musculaire.

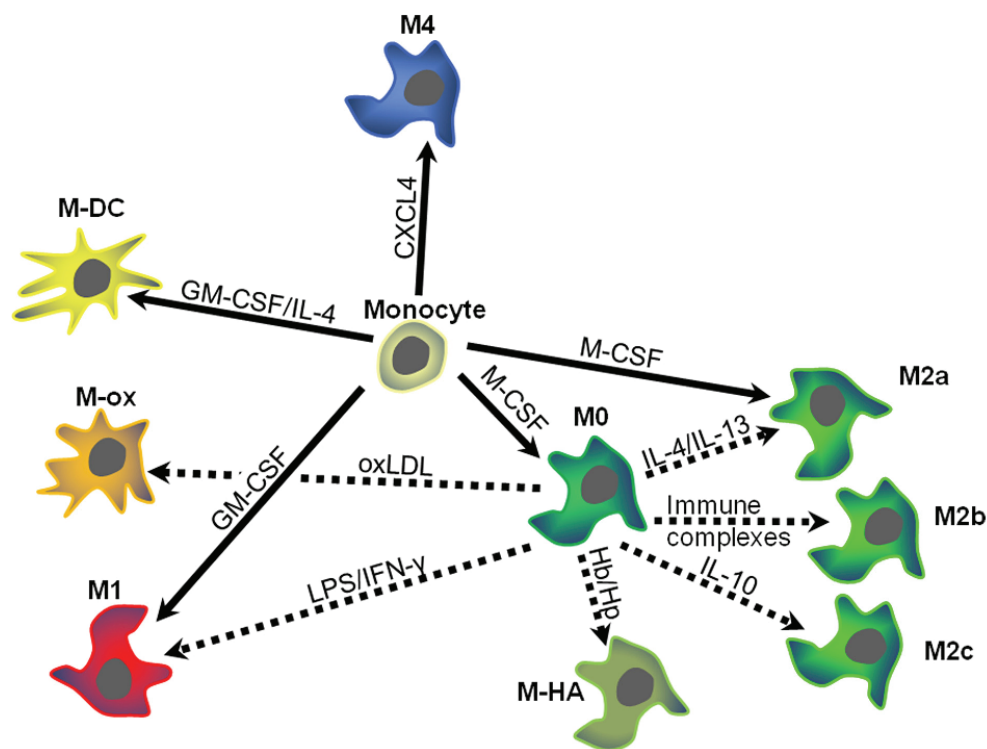


Figure 8 : Diversité de phénotype des macrophages dans l'inflammation

(Gleissner et al., 2012)

Les monocytes se différencient en fonction du microenvironnement. Ainsi, les facteurs de croissance, les chimiokines ou les lipoprotéines présents dans le microenvironnement peuvent induire des spécifiques populations des macrophages. Les flèches en pointillés indiquent un monocyte/macrophage en différenciation, tandis que les flèches pleines indiquent la

polarisation des macrophages. Une différence importante entre différenciation et polarisation est le fait que la polarisation soit un processus réversible tandis qu'une différenciation il semble être irréversible (Porcheray et al., 2005).

2.4 Rôle des macrophages dérivés de la moelle osseuse dans la résolution de l'inflammation musculaire

Une lésion stérile du muscle squelettique déclenche une réaction inflammatoire caractérisée par une invasion rapide et séquentielle de populations de cellules du système immunitaire qui persistent pendant la régénération et la croissance musculaire. Le processus de régénération comprend une phase pro-inflammatoire initiale caractérisée par la libération de cytokines et de chimiokines qui favorisent l'infiltration de ces cellules immunitaires sur le site de la lésion afin d'éliminer les débris cellulaires. Les neutrophiles constituent la première population de leucocytes dans les tissus endommagés. Ils apparaissent moins de 2 heures après une lésion musculaire, atteignant un maximum de concentration entre 6 et 24 heures après une blessure et diminuent rapidement. Ils libèrent des enzymes protéolytiques qui contribuent à la lyse des membranes musculaires (Zerria et al., 2006). Il a également été suggéré que les neutrophiles phagocytent les débris tissulaires et activent les cellules satellites (Teixeira et al., 2003). Des résultats récents ont indiqué que les effets des neutrophiles sur le muscle squelettique pourraient dépendre du type de lésion. En effet, une lésion n'a pas été capable de stimuler l'infiltration à long terme des neutrophiles, différemment d'une lésion induite par des produits microbiens (Dumont et al., 2008). Après l'invasion des neutrophiles, les macrophages s'accumulent et deviennent la population leucocytaire dominante (Chazaud et al., 2014). Ils sont dérivés de monocytes sanguins qui traversent la barrière endothéliale de vaisseaux jusqu'au tissu lésé (Johnson-Léger et al., 2000). Grâce au marqueur Ly6C il a été observé que seuls les monocytes Ly6C provenant de la circulation sanguine s'infiltrèrent dans la zone musculaire lésée (Arnold et al., 2007). Les macrophages phagocytent les cellules apoptotiques ainsi que les débris cellulaires et produisent un ensemble de signaux impliqués dans l'activation des précurseurs myogéniques, le remodelage de la matrice et la formation de vaisseaux (Chazaud et al., 2003 ; Saclier et al., 2013).

Des études *in vivo* ont montré que les macrophages jouent un rôle central dans le processus de réparation musculaire (Mounier et al., 2013 ; Dumont et al., 2010 ; Varga et al., 2013; Bosurgi et al., 2012). En effet, les données de plusieurs modèles de lésions musculaires (ischémie des membres postérieurs, brûlure induite par le froid, injections d'agents myotoxiques) indiquent

qu'un défaut sur le recrutement des macrophages induit un retard de la régénération (Chazaud et al., 2014 ; Dumont et al., 2010 ; Arnold et al., 2007 ; Mounier et al., 2013 ; Perdiguero et al., 2011), caractérisé par la persistance d'adipocytes intramusculaires, des myofibres centronucléées et la fibrose. Arnold et collaborateurs ont identifié une population de monocytes circulants recrutés qui se différencient en macrophage pro-inflammatoire en arrivant sur le site lésé (Arnold et al., 2007) contribuant à la prolifération des précurseurs myogéniques. Les macrophages résidents contribuent également à ce processus. Ils sont présents dans le muscle associé au tissu conjonctif épimysial (également appelé fascia) et sécrètent des chimiokines, telles que MCP1/CCL2, qui attirent les monocytes du sang (Brigitte et al., 2010). En effet, l'expression du récepteur MCP1/CCR2 sur les cellules dérivées de la moelle osseuse est essentielle à la régénération du muscle squelettique. Une étude a démontré qu'en absence de ce récepteur les souris présentaient une déficience du recrutement des macrophages ainsi que de la résolution de la nécrose, après une lésion induite par la cardiotoxine (CTX) (Warren et al., 2005 ; Martinez et al., 2010). De plus, il a été démontré que CXCL16 régule l'entrée de monocytes/macrophages dans le muscle lésé (Zhang et al., 2009). L'inhibition de la voie CXCL16 a entraîné l'infiltration persistante des neutrophiles et un défaut du recrutement des macrophages. Par conséquent, il a été observé une inflammation persistante pendant la régénération musculaire en absence de cette population. Bien que l'identification des différents phénotypes des macrophages *in vitro* soit bien décrite, les populations présentes *in vivo* au cours de l'inflammation du muscle squelettique semblent ne pas avoir les mêmes caractéristiques. Cela est dû au fait que les macrophages sont exposés à un microenvironnement plus complexe concernant les conditions de culture cellulaire (le stimulus par des concentrations des cytokines sont bien contrôlées par le manipulateur). Au cours des dernières années, la caractérisation *in vivo* du phénotype des macrophages au cours de la réparation des tissus a fait l'objet d'une étude approfondie. Cette population est différente des populations canoniques M1 et M2. Ils sécrètent des signaux inflammatoires, tels que TNF α , IL-1 β , MCP1 et contribuent au processus de phagocytose des cellules myogéniques apoptotiques ou nécrotiques, ce qui induit le changement de phénotype des macrophages pro vers un phénotype anti-inflammatoire. Ce phénotype contribue à atténuer la réponse inflammatoire musculaire en sécrétant du TGF β et de l'IL-10. De plus, ils agissent sur la différenciation et sur la fusion des progéniteurs musculaires en sécrétant des cytokines qui ont un rôle trophique, telles que IGF1 et IL-10 (Arnold et al., 2007 ; Saclier et al., 2013). En outre, récemment, la GDF3 a été décrite comme une nouvelle molécule sécrétée par les macrophages anti-inflammatoires jouant un rôle sur la fusion de cellules musculaires (Varga et Mounier et al., 2016). Dans ce contexte, une nouvelle

nomenclature a été proposé par notre équipe, appelée Ly6C⁺ pour la population pro-inflammatoire et Ly6C⁻ pour la population anti-inflammatoire (Varga et al., 2016 ; Theret et al., 2019). Des caractéristiques concernant ces populations pendant la régénération ont été également décrites dans cette étude. En effet, les macrophages *Ly6C (pos)* présentent un profil inflammatoire indépendant de l'IFN- γ (voie canonique de M1) et expriment des protéines de phase aigüe comme *Lcn2*, *Lrg1*, *Hp* et *Saa3*. En revanche, les macrophages *Ly6C (neg)*, associées au profil anti-inflammatoire, sécrètent des molécules impliquées dans les communications intercellulaires, notamment les molécules liées à la matrice comme *Bgn* et *Postn* (Varga et al., 2016). De plus, les études ont démontré que les monocytes Ly6C^{neg} ne sont jamais recrutés dans un muscle en régénération (Arnold et al., 2007) comme dans d'autres tissus (Chazaud, 2016). Cela s'est confirmé dans un modèle génétique dépourvu de monocytes Ly6C^{neg} (*nur77 KO*) qui présentent une réponse inflammatoire et une régénération musculaire normales (Varga et al., 2013). Dans les tissus au repos, les monocytes Ly6C^{neg} contrôlent l'intégrité de l'endothélium avec les neutrophiles, en remplaçant les cellules endothéliales endommagées (Carlin et al., 2013). Ainsi, les deux sous-populations de monocytes en circulation ont des rôles spécifiques : Ly6C^{neg} dans les vaisseaux et les monocytes Ly6C^{pos} infiltrant les tissus endommagés.

Ainsi, la réponse des macrophages au niveau moléculaire après une lésion tissulaire est associée à une signature spécifique à chaque étape de la réparation tissulaire.

2.5 Mécanismes moléculaires contrôlant l'activation des macrophages après une lésion musculaire

Les voies cellulaires et moléculaires impliquées dans la régulation du phénotype des macrophages au long de la régénération musculaire ont été étudiées ces dernières années. Il a été démontré que la protéine de liaison aux éléments de réponse à l'AMPc (CREB) était un facteur de transcription important pour la régulation des gènes comme IL-10 associé au phénotype anti-inflammatoire. De plus, il a été identifié qu'après une lésion musculaire, l'activité phagocytaire des débris cellulaires par les macrophages anti-inflammatoires a été préservée alors que les fibres musculaires présentaient un défaut de régénération, ce qui suggère que la persistance d'un seul profil de macrophages (les anti-inflammatoires) dans le muscle lésé n'est pas suffisante pour une régénération efficace (Ruffell et al., 2009).

Une autre molécule jouant un rôle clé dans la régulation de la transition phénotypique des macrophages est la MAP kinase phosphatase (MKP-1) (Perdiguero et al., 2011). Les analyses d'expression génique des macrophages musculaires déficients pour la protéine MKP-1 ont

indiqué la capacité de cette protéine à contrôler la réponse inflammatoire ainsi que le passage au phénotype des macrophages anti-inflammatoires *via* la régulation de la p38 MAPK. De plus, l'absence de MKP-1 a été corrélée avec une régénération musculaire défectueuse, caractérisée par une nécrose persistante ainsi qu'une croissance ralentie des myofibres en régénération. Ce phénotype a pu être restauré par une greffe de moelle osseuse, ce qui suggère fortement que la présence de cette protéine dans les macrophages régule la réparation des myofibres (Perdiguero et al., 2011). Dans ce contexte, une étude a démontré l'augmentation d'expression du récepteur C3ar dans les tissus musculaires 3 jours après une lésion induite par la cardiotoxine (Zhang et al., 2011). Ce récepteur induit la transcription de gènes pro-inflammatoires comme IL-6 et TNF dans les macrophages, par l'activation de la voie p38 MAPK (Napier et al., 2016). De plus, il a été démontré qu'en absence de C3aR les monocytes expriment un niveau réduit de cytokines pro-inflammatoires comme IL6 et CCL3 et que ce phénotype conduit à une régénération altérée avec l'accumulation de petites fibres et à une infiltration réduite de monocytes/macrophages après la lésion, soulignant l'importance de ce récepteur pour la régénération tissulaire (Zhang et al., 2017). Dans ce contexte, il a été démontré que les glucocorticoïdes présentent également un rôle sur la régénération musculaire, médié par les cytokines. En effet, en absence du récepteur aux glucocorticoïdes les macrophages présentent un défaut de la répression des cytokines IL1- β , MCP1, MIP2 et IP10, suggérant un déséquilibre sur l'acquisition du phénotype anti-inflammatoire (Desgeorges et al., 2019). Récemment, il a également été démontré que la protéine kinase activée par l'AMP (AMPK) joue un rôle important dans la régulation des macrophages lors de la régénération du muscle squelettique. L'augmentation de l'activité de l'AMPK a été associée à une diminution du statut pro-inflammatoire des macrophages (Sag et al., 2008). En effet, les macrophages dépourvus d'AMPK α 1 ont un retard d'acquisition du phénotype anti-inflammatoire et présentent également un défaut de leur activité phagocytaire (Mounier et al., 2013). Dans ce contexte, une étude a montré l'implication de la protéine annexine A1 sur l'activation des macrophages médiée par l'AMPK. L'annexine A1 est déjà connue pour ses effets biologiques sur l'efferocytose des macrophages (Dalli et al., 2012 ; Scannell et al., 2007). La nouvelle hypothèse investiguée et prouvée dans ce travail est que l'annexine A1 et son récepteur FPR2/ALX peuvent être le déclencheur de l'activation de l'AMPK, et donc un facteur majeur du changement de phénotype des macrophages anti-inflammatoires, favorisant la résolution inflammatoire et la restauration de l'homéostasie du tissu musculaire squelettique (Mcarthur et al., 2019). En outre, il a été étudié le rôle de l'AMPK dans l'inflammation chronique causée par la dystrophie musculaire de Duchenne. L'activation

de l'AMPK diminue l'expression de *Itbp4* dans les macrophages pro-inflammatoires (Ly6C^{pos}) qui par conséquent atténue la production de TGF- β 1, réduit la fibrose et améliore la force musculaire (Juban et al., 2018). Récemment, il a été démontré qu'une population de cellules T régulatrices (Treg) infiltrait les muscles lésés et soutenait la réparation musculaire en modulant les différentes étapes du processus de régénération. Par contre, les mécanismes précis et les molécules potentiellement responsables ne sont pas encore décrits (Burzyn et al., 2013). Dans ce contexte, une étude a montré le rôle des cellules Treg sur le changement de phénotype de macrophages au cours de la régénération. Leur absence après la lésion musculaire a favorisé la production d'IFN- γ , ce qui a finalement provoqué la dérégulation de l'acquisition du phénotype anti-inflammatoire de macrophages, ainsi que l'augmentation de l'inflammation et de la fibrose, indiquant une réparation musculaire compromise. Cette étude a permis d'identifier une régulation centrée sur l'IFN- γ par laquelle les cellules Treg contrôlent le changement de phénotype des macrophages et l'inflammation lors de la régénération du muscle squelettique (Panduro et al., 2018).

2.6 Cinétique d'activation de macrophages, ses phénotypes et profils métaboliques selon la durée de la lésion

Notre équipe a démontré que dans un modèle de lésion induite par la cardiotoxine, les macrophages dérivés de monocytes circulants infiltrèrent le muscle en 24 heures. Dès le début du deuxième jour, le nombre de cellules Ly6C positives (macrophages pro-inflammatoires) diminuent jusqu'à l'apparition de cellules Ly6C négatives (macrophages anti-inflammatoires). Ce processus de polarisation de macrophages pro-inflammatoires vers un phénotype anti-inflammatoire lors de la phagocytose de débris musculaires nécrotiques fait que ces macrophages sécrètent du TGF- β 1 et inhibent la production de TNF- α (Arnold et al., 2007). À la fin du quatrième jour, presque tous les macrophages Ly6C positifs se sont convertis en Ly6C négatifs (Varga et al., 2016). Il a été démontré que ce changement de phénotype dans le muscle est une étape clé de la réparation musculaire (Figure 6). Cette séquence d'événements de l'infiltration de macrophages pro-inflammatoires au changement de phénotype vers un phénotype anti-inflammatoire semble être homogène puisqu'il a été décrit après une lésion cardiaque (Nahrendorf et al., 2010), au sein du système nerveux central (Michelucci et al., 2009; Fumagalli et al., 2015), dans le foie (Pellicoro et al., 2014), dans le rein (Ricardo et al., 2008; Rogers et al., 2014) et dans le muscle squelettique (Arnold et al., 2007; Saclier et al., 2013; Mounier et al., 2013). En effet, au cours de la régénération, les macrophages pro-inflammatoires

peuvent produire des facteurs de croissance pro-régénératifs tels que l'IGF-1 pour stimuler la prolifération des cellules souches musculaires. En plus de stimuler la prolifération de cellules souches musculaires, les macrophages pro-inflammatoires peuvent également inhiber leur apoptose (Chazaud et al., 2003).

Dans ce contexte, le rôle des cellules myéloïdes dans le processus de réparation a été également mis en évidence par des études de déplétion montrant un retard de la régénération du muscle squelettique en l'absence de macrophages (Arnold et al., 2007). La perte de CCR2, qui est un récepteur essentiel pour la polarisation de macrophages pro-inflammatoires, (Dal-Secco et al., 2015 ; Tacke et al., 2007) provoque une réduction de l'infiltrat de ces cellules inflammatoires et par conséquent une régénération altérée, suggérant que le recrutement de macrophages pro-inflammatoires est essentiel pour réparer le tissu musculaire (Lu et al., 2010). En revanche, les macrophages anti-inflammatoires expriment le récepteur CX3CR1 (un récepteur à la chimiokine *fractalkine*, exprimé lors de la régénération musculaire jusqu'à 4 jours post-lésion) qui régule les fonctions de phagocytose, la production d'apolipoprotéine E (ApoE), et la sécrétion de cytokines anti-inflammatoires comme l'IL-6 notamment impliquées dans la fusion des cellules musculaires (Zhao et al., 2016 ; Arnold et al., 2015). Ensuite, lorsque les myofibres sont complètement formées et que le muscle est revenu à son homéostasie d'origine, le nombre de macrophages se réduit drastiquement selon un mécanisme encore inconnu. Il est supposé que certains macrophages remontent dans l'épimysium où ils sont situés dans un muscle normal, tandis que d'autres quittent le muscle par la voie lymphatique.

Le changement métabolique des macrophages accompagne la résolution de l'inflammation. Les espèces réactives d'oxygène sont des médiateurs importants des fonctions des macrophages lors de la réponse immunitaire (Brüne et al., 2013, Forman et al., 2001). Cependant, malgré le fait que les facteurs induits par l'hypoxie (HIFs) soient des cibles de ROS, il a été démontré par notre équipe que la suppression des HIF1 α ou HIF2 α dans les macrophages pro-inflammatoires n'avait pas de rôle sur l'acquisition d'un phénotype anti-inflammatoire dans la régénération musculaire, indiquant que les HIFs dans les macrophages ne jouent pas un rôle crucial lors de la régénération du muscle squelettique induite par des lésions tissulaires stériles (Gondin et al., 2015), suggérant que la régulation de ROS sur les phénotypes des macrophages doit être encore élucidée. Dans ce contexte, l'expression des gènes associés au stress oxydant a été analysée par notre équipe dans les macrophages présents au cours de la régénération musculaire. Un ensemble de 30 gènes anti-oxydants a été analysé dans les deux phénotypes de macrophages et aucune expression différentielle significative a été trouvée parmi ces gènes. De plus, la

production d'une espèce dérivée de l'oxygène appelée anion superoxyde a été évaluée 2 jours après une lésion. Aucune différence n'a été observée, suggérant que les macrophages Ly6C^{pos} (pro-inflammatoire) et Ly6C^{neg} (anti-inflammatoire) ne produisent et ne sécrètent pas de ROS (Le Moal et al., 2018).

Au cours des dernières étapes de la régénération musculaire, les macrophages Ly6C^{neg} (macrophages anti-inflammatoires) se caractérisent par une régulation des gènes impliqués dans le métabolisme de la glutamine, associé au métabolisme oxydatif, caractéristique des macrophages M2 *in vitro* (induit par l'IL-4). Cependant, les macrophages Ly6C^{neg} n'expriment pas les marqueurs M2 canoniques (IL-4) et leur profil d'expression ne correspond à aucun des états d'activation *in vitro* testés jusqu'à présent (Jha et al., 2015). En conclusion, l'analyse cinétique est très importante pour identifier l'expression génique dynamique des macrophages *in vivo* ainsi que les modifications importantes de leurs métabolismes associées à la régénération musculaire.

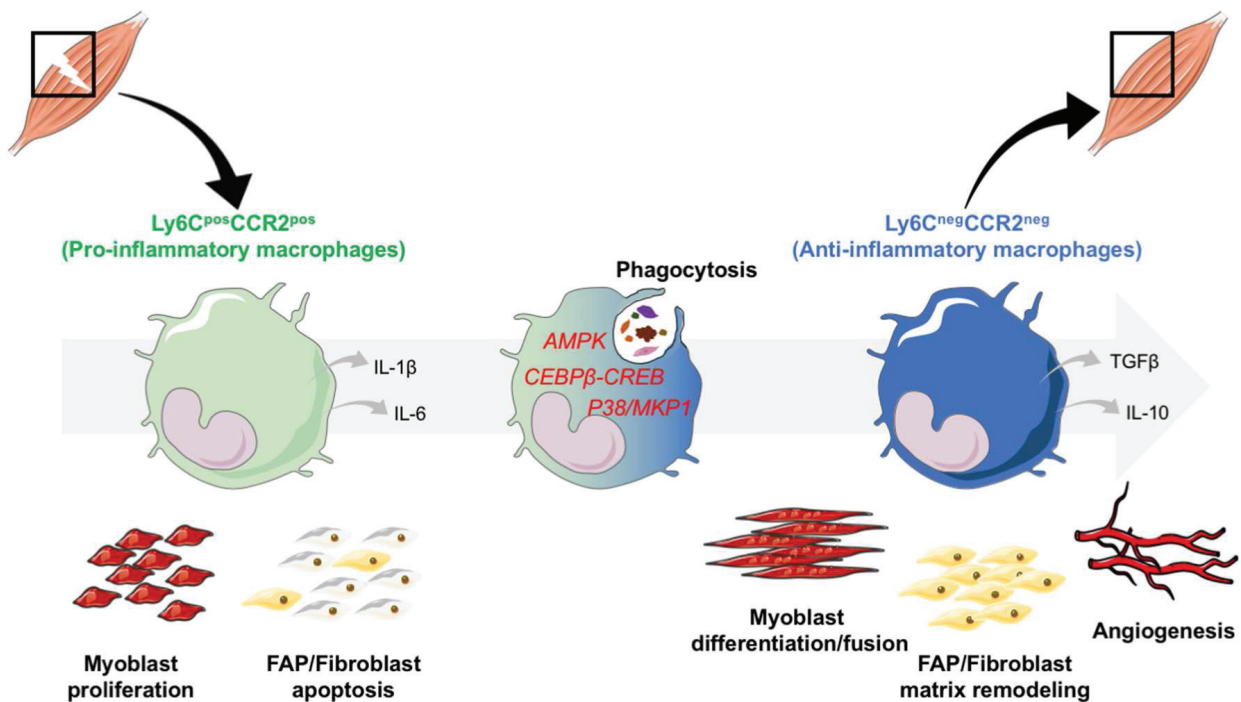


Figure 9 : Les profils des macrophages pendant la régénération musculaire

(Desgeorges et al., 2019)

Après la lésion, les monocytes infiltrent le muscle endommagé et acquièrent un phénotype pro-inflammatoire Ly6C^{pos}. Ces cellules sécrètent des cytokines inflammatoires telles que l'IL-1 β et l'IL-6 et exercent des fonctions spécifiques en stimulant la prolifération des précurseurs myogéniques (myoblastes) et déclenchent l'apoptose des fibroblastes afin d'éviter un dépôt excessif de matrice. Lors de la phagocytose, les voies AMPK, CEBP β -CREB et P38/MKP1 sont activées et les macrophages pro-inflammatoires changent leur phénotype vers un phénotype anti-inflammatoire. Grâce à la sécrétion de divers facteurs, parmi lesquels les cytokines anti-inflammatoires IL-10 et TGF β , les macrophages anti-inflammatoires interviennent dans la réparation et la régénération des tissus en stimulant la différenciation et la fusion des myoblastes ainsi que celle des FAP/fibroblastes pour le remodelage de la matrice et de l'angiogenèse.

3. Le sélénium et les sélénoprotéines

Le sélénium, un oligo-élément essentiel, a été découvert par le chimiste suédois Jöns Jacob Berzelius en 1817. Le sélénium a été reconnu pour la première fois comme ayant une importance biologique au début des années 1930, lorsque sa toxicité a été démontrée chez des animaux dans certaines zones du Haut-Midwest des Etats-Unis. Dans les années 1950, il a été démontré que de faibles quantités de l'élément étaient avantageuses pour les procaryotes, les rats et les poulets (Pinsent, 1954 ; Schwarz, 1957). L'avantage pour les animaux était la protection contre les affections pathologiques causées par des carences simultanées en sélénium et en vitamine E. D'autres recherches ont révélé que plusieurs maladies vétérinaires supposées être causées uniquement par la carence en vitamine E étaient en réalité causées par une carence en sélénium combinée à celle de la vitamine E. Comme la vitamine E est connue pour ses propriétés antioxydantes, il a été émis l'hypothèse que le sélénium avait également des propriétés antioxydantes et que ces deux micronutriments pourraient agir en synergie *in vivo* pour la protection cellulaire contre les dommages oxydatifs. À la fin des années 1960, d'autres recherches ont révélé que des rats souffrant d'une carence en sélénium et recevant une quantité suffisante de vitamine E ont été incapables de grandir normalement par rapport au groupe contrôle et ne pouvaient se reproduire que si du sélénium leur était fourni (McCoy et al., 1969). Cela prouvait que le sélénium était un micronutriment essentiel. Cependant, il reste à déterminer les mécanismes des fonctions biologiques du sélénium *in vivo*.

Le groupe de recherche dirigé par le professeur Hoeklad a étudié la possibilité que le sélénium soit nécessaire à la fonction de l'enzyme glutathion peroxydase (GPX). Il a été démontré que cette enzyme catabolise le peroxyde d'hydrogène et les hydroperoxydes organiques, assurant ainsi une protection contre les dommages oxydatifs. Leur article novateur publié dans Science en 1973 montrait que les érythrocytes de rats privés de sélénium étaient dépourvus de l'activité de la GPX (Rotruck et al., 1973). Ces résultats ont souligné l'importance des recherches visant à établir les besoins de ce micronutriment pour la consommation humaine et à l'approbation du sélénium comme un additif alimentaire par la FDA (*Food and Drug Administration*).

Depuis 1974, 25 protéines contenant du sélénium (*i.e.* les sélénoprotéines) ont été caractérisées chez l'homme (et 24 chez le rongeur). En raison du potentiel d'oxydo-réduction du sélénium sous la forme de sélénocystéine présente dans les sélénoprotéines, une grande partie d'entre elles possèdent des activités antioxydantes. Par exemple, la sélénoprotéine P est responsable du transport du sélénium du foie vers les tissus extra-hépatiques, mais possède également des propriétés antioxydantes grâce à son activité peroxydase présente à l'extrémité N-terminale

(Burk et al., 2015). Pourtant, d'autres sélénoprotéines, comme les iodothyronine déiodinases, possèdent la fonction de réguler les niveaux d'hormones thyroïdiennes dans les tissus sans avoir un effet antioxydant cellulaire, suggérant d'autres fonctions biologiques consacrées aux sélénoprotéines qui non seulement ses propriétés antioxydantes. Au cours des 45 dernières années (Hafeman et al., 1974), les nutritionnistes ont essayé de quantifier les effets des apports alimentaires en sélénium sur l'expression des sélénoprotéines dans les tissus de différentes espèces. Il a été démontré que l'expression des gènes, la production de protéines et l'activité enzymatique des sélénoprotéines sont régulées négativement par la carence en sélénium alimentaire. Cependant, d'autres sélénoprotéines ont été moins affectée par les apports alimentaires en sélénium, suggérant que la fonction de certaines sélénoprotéines n'est pas régulée par le sélénium ingéré (Li et al., 2018 ; Chen et al., 2018 ; Sunde et al., 2016, Huang et al., 2018). Afin de continuer à évaluer cette question, il a été documenté la présence de deux enzymes dépendantes du sélénium, les iodothyronines déiodinases de type 1 et de type 2 (DIO 1 et DIO 2) qui sont également des sélénoprotéines, ayant comme fonction principale catalyser la conversion de la thyroxine (T4) en triiodothyronine (T3) (Schomburg, 2011). Il a été démontré qu'une carence en sélénium a été capable de réduire l'expression et l'activité de ces enzymes, ce qui a entraîné à une augmentation de T4 et une diminution du taux de T3. De plus, des expériences chez des rongeurs nourris avec un régime pauvre en sélénium ont confirmé une augmentation des taux de T4 et une diminution des niveaux de T3 (Bermano et al., 1995). Kawai et ses collaborateurs ont récemment vérifié que les enfants porteurs de carence de sélénium avaient des niveaux élevés de T4 libre qui ont été réduits avec la supplémentation en sélénium (Kawai et al., 2018). En outre, plusieurs sélénoprotéines ont été caractérisées et impliquées dans la régulation de l'état redox et la fonction des thyrocytes (Figure 10), ce que suggère que différentes sélénoprotéines régulées par le sélénium obtenu par la diète peuvent être associées à des maladies hormonales comme l'hypothyroïdie et l'hyperthyroïdie.

Parmi les sélénoprotéines répondant aux apports alimentaires en sélénium, leurs réponses varient selon les espèces et les tissus. Une notion intéressante est proposée selon laquelle les sélénoprotéines les moins susceptibles à réduire l'expression, malgré une carence alimentaire en sélénium, pourraient avoir des fonctions essentielles pour la survie à court terme, tandis que celles susceptibles à des modifications n'ont pas de fonctions essentielles mais des avantages à long terme (McCann et al., 2011). Le sélénium alimentaire n'est pas le seul nutriment qui régule l'expression des sélénoprotéines. La carence en vitamine E dans l'alimentation a réduit l'activité d'un total de 10 sélénoprotéines dans le foie, le pancréas et le muscle (Huang et al., 2011, Huang et al., 2015). De même, une alimentation riche en matières grasses a modulé l'expression des

gènes ainsi que la production de 14 sélénoprotéines dans plusieurs tissus de porc (Zhao et al., 2015).

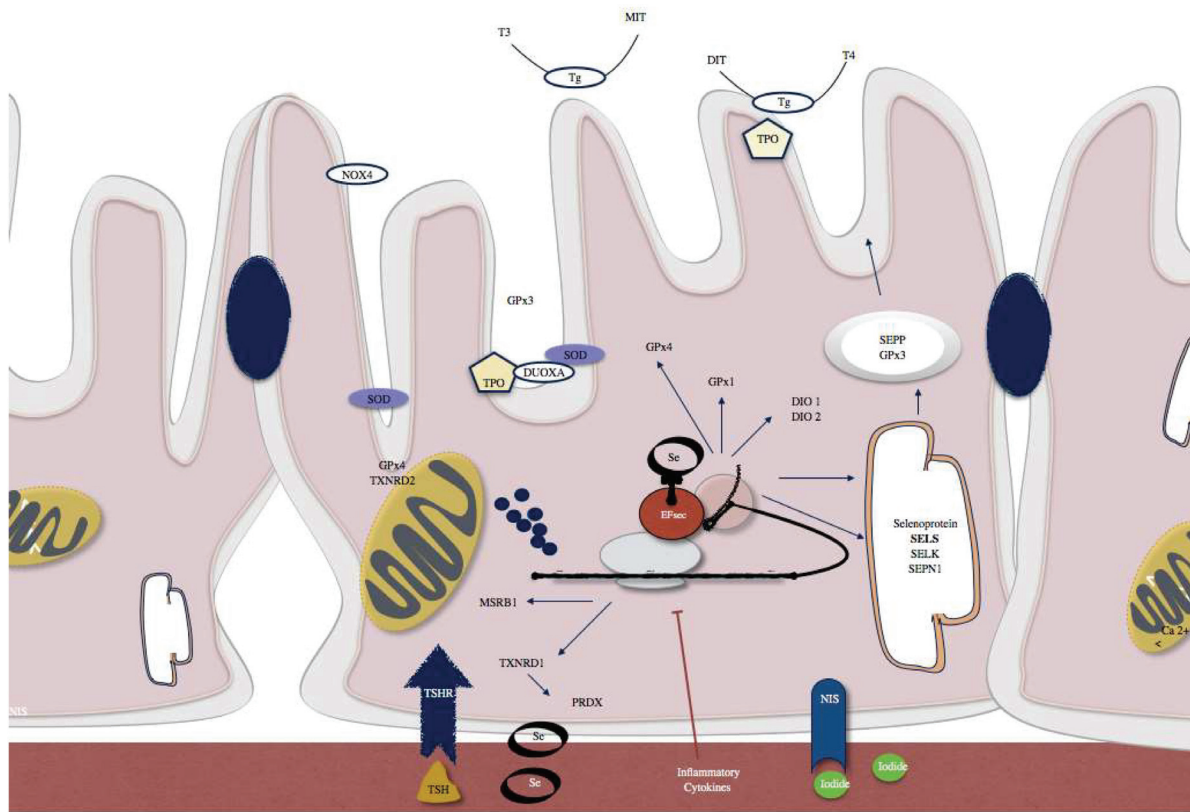


Figure 10 : Les exemples de sélénoprotéines présentes dans les thyrocytes.

(Santos et al., 2018)

La sélénoprotéine P (SEPP) et la glutathion peroxydase 3 (GPx3) sont activement sécrétés par les thyrocytes. SELENOS et SELENOK jouent un rôle dans les voies de signalisation dans le réticulum endoplasmique (ER). Les iodothyronine déiodinases de type 1 et 2 (DIO1, DIO2), GPx1 et GPx4, la méthionine sulfoxyde réductase B1 (MSRB1), le sélénophosphate synthétase 2 (SPS2) et la thiorédoxine réductase 1 (TXNRD1) sont des sélénoenzymes intracellulaires. TXNRD2 et l'isoenzyme GPx4 sont localisées dans les mitochondries. SBP2 est un facteur responsable du contrôle de la translocation de la sélénoprotéine.

3.1 Biosynthèse de la sélénoprotéine

L'ARN messager (ARNm) d'une sélénoprotéine a deux caractéristiques que les autres ARNm n'ont pas. La première correspond au codon UGA dans le cadre de lecture ouvert (ORF), et la deuxième à une structure en boucle-tige spécialisée dans la région non traduite en 3' (3'UTR). La structure tige-boucle est connue sous le nom d'élément de séquence d'insertion de

sélénocystéine (SECIS). Les codons UGA sont connus comme un signal classique de terminaison de la traduction du ARNm. Par contre, dans le cas de l'ARNm de la sélénoprotéine les codons UGA possèdent la fonction d'insérer une sélénocystéine (Sec) sur son ARNm.

Ainsi, nous pouvons constater que les sélénoprotéines sont des protéines auxquelles les sélénocystéines (Sec) sont incorporées de manière co-translationnelle (un mécanisme qui permet l'insertion d'un acide aminé dans une protéine toute au cours de sa traduction). De plus, la Sec synthase (SecS) semble être le moyen par lequel les sélénocystéines sont synthétisées chez les eucaryotes.

La SecS est une enzyme qui intervient dans la biosynthèse de la sélénocystéine et possède comme rôle principal de convertir le L-séryl-ARNt^{Sec} en L-sélénocystéinyl-ARNt^{Sec}. La conservation de cette voie globale de la biosynthèse de Sec suggère qu'elle est également active chez d'autres eucaryotes qui synthétisent des sélénoprotéines (Wurth et al., 2014).

3.2. L'incorporation de sélénocystéine dans les sélénoprotéines

L'incorporation de sélénocystéines dans les sélénoprotéines est un processus nécessaire pour obtenir une protéine fonctionnelle qui dépend de plusieurs facteurs résumés ci-dessous.

3.2.1 L'élément SECIS et les partenaires protéiques

Cette séquence d'insertion de la sélénocystéine (SECIS) est un élément important pour la biosynthèse des sélénoprotéines, qui varie d'une sélénoprotéine à l'autre (Figure 7). Sa présence est obligatoire pour permettre au ribosome de décoder le codon UGA de la Sec (Walczak et al., 1998). L'élément SECIS n'est pas le seul élément clé pour que l'insertion de Sec soit effectuée correctement. Certains partenaires contribuent également à ce mécanisme. Le SBP2 est un exemple de ces partenaires. Sa contribution à l'incorporation de la Sec est due à son interaction transitoire avec SECIS et le facteur d'élongation spécifique (eEFSec) (Copeland et al., 2001). Suite à la découverte de SBP2, un rôle dans le processus d'intégration de la Sec a été également identifié pour l'eEFSec et pour la protéine ribosomale L30 (RPL30). Enfin, la nécessité d'avoir des partenaires protéiques pour que l'incorporation de Sec soit effectuée semble être importante (Figure 8).

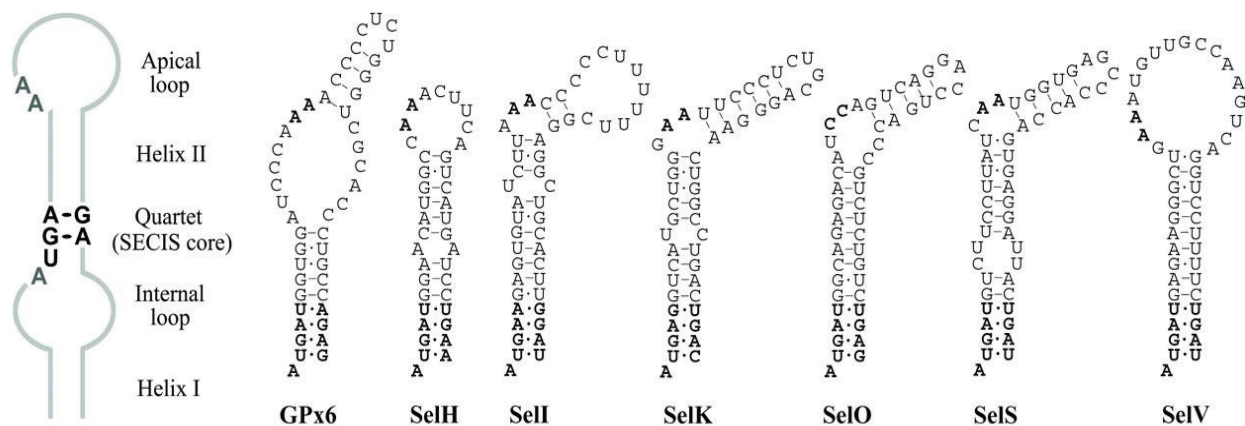


Figure 11 : L'élément SECIS suit un consensus d'acide aminé et a une structure secondaire variable selon les différentes sélénoprotéines. (Olson et al., 2010)

3.3 Sélénium : le micronutriment nécessaire à la sélénoprotéine fonctionnelle

La compréhension de l'incorporation du sélénium dans les sélénoprotéines ainsi que les implications moléculaires de ce processus a progressé rapidement au cours des dernières années. Le sélénium (Se) est présent dans ces protéines sous deux formes (Hatfield et al., 2002). Pour la première forme, le Se est inséré dans la protéine de manière post-traductionnelle comme cofacteur dissociable. Cette façon d'insertion est rare et trouvée dans les enzymes bactériennes (Gladyshev et al., 1996). En ce qui concerne la deuxième forme, le Se est inséré de manière co-traductionnelle dans la protéine comme acide aminé Sec. Ce processus est responsable de la majorité des effets biologiques du Se (Hatfield et al., 2012). Il reste crucial de corrélérer cette incorporation à l'importance d'une sélénoprotéine fonctionnelle, afin d'améliorer la compréhension de l'expression de ces protéines.

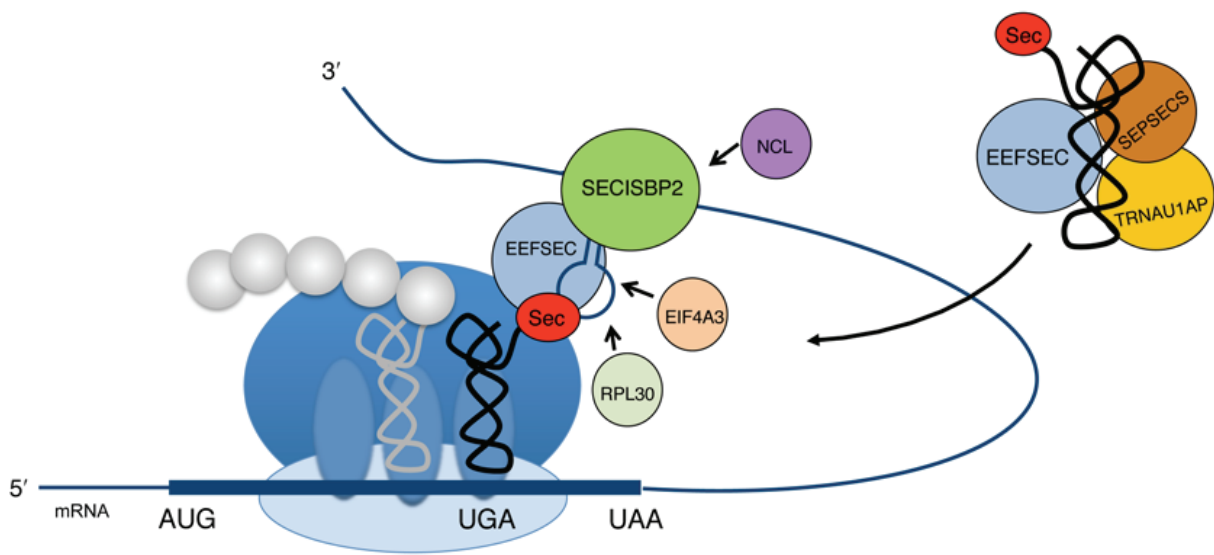


Figure 12 : **Machinerie de la biosynthèse de la sélénoprotéine.** (Schoenmakers et al., 2016)

Un complexe multipartenaire contenant l'isoforme d'ARNt de la sélénocystéine 1 (TRNAU1AP), EEFSEC et SECISBP2 sont liés à l'élément SECIS pour médier l'incorporation de la sélénocystéine (Sec) dans le polypeptide. D'autres facteurs, tels que la protéine ribosomale L30 (RPL30), le facteur d'initiation de la traduction eucaryote 4A3 (EIF4A3) et la nucléoline (NCL), régulent également le complexe processus d'insertion de Sec (Schoenmakers et al., 2016).

3.3.1 L'importance physiologique de la sélénoprotéine fonctionnelle

La régulation de la fonctionnalité de ces sélénoprotéines reste encore mal connue. Ainsi, l'objet de ce sous-chapitre est de présenter les principales mutations déjà décrites dans le processus de biosynthèse des sélénoprotéines, spécialement la sélénoprotéine P et la glutathion peroxidase 3, leur impact sur la fonctionnalité de ces protéines et les conséquences physiologiques qui en résultent.

Il a été décrit deux polymorphismes nucléotidiques fonctionnels (SNP) du gène *Sepp1*. Le premier est situé dans la région codante du gène qui modifie l'acide aminé alanine en thréonine (Ala234Thr). Ce polymorphisme inhibe les taux plasmatiques de sélénium chez l'adulte sain même en présence d'une supplémentation avec du sélénite de sodium (Meplan et al., 2007). Une autre étude a démontré, en sujets sains, le rôle de la supplémentation de sélénium sur l'augmentation des concentrations et de l'activité de la sélénoprotéine dans le plasma, dans les érythrocytes ainsi que dans les lymphocytes, corroborant les résultats où le polymorphisme peut affecter le transport du Se dans les tissus (Clausen et al., 1988). Meplan et collaborateurs suggèrent que ce même polymorphisme a été associé au risque de cancer colorectal (Meplan et al., 2010). Cela corrobore d'autres études qui montrent un risque de cancer de la prostate, un autre cancer hormono-dépendant (Steinbrenner et al., 2013). Le deuxième polymorphisme (RS7579) est situé dans la région 3'UTR de *Sepp1*, important pour l'insertion de Sec, et module les concentrations plasmatiques de *Sepp1* (Meplan et al., 2007).

Les polymorphismes du gène *Sepp1* ont été également étudiés en tant que facteur de risque des maladies métaboliques inflammatoires. Dans ce contexte, une récente étude a évalué ces polymorphismes et le risque de diabète gestationnel. Les résultats ont pu conclure que malgré son effet n'était pas capable de modifier le risque du diabète, l'hémoglobine glyquée, l'insuline à jeun et les cholestérols totaux étaient plus élevés (Akbaba et al., 2018). En revanche, la supplémentation alimentaire riche en sélénium pendant huit semaines a réduit la concentration de cholestérol plasmatique totale chez l'adulte sain et cette réponse a été modulée par *Sepp1*, suggérant que les polymorphismes peuvent réguler la concentration plasmatique de *Sepp1* (Donadio et al., 2017). De plus, une autre étude a identifié une mutation de l'ARN de transfert (ARNt) qui altère la synthèse de sélénoprotéines démontrant ainsi pour la première fois l'importance de l'ARNt fonctionnel pour leur synthèse (Schoenmakers et al., 2016).

Les polymorphismes du gène *GPX3* ont été également analysés. Il a été établi que les individus porteurs de certaines combinaisons d'allèles *GPX3* (CCTCCTTC -942, -927, -861, -568, -518, -302, -284 et 65) présentent un risque plus élevé d'accident ischémique cérébral (Grond-

Ginsbach et al., 2007) et de thrombose veineuse cérébrale par rapport aux sujets n'exposant pas ces polymorphismes (Voetch et al., 2007 ; Voetch et al., 2008). En outre, le risque de syndrome métabolique (SM) a été associé à ces polymorphismes. En effet, il a été démontré que les concentrations sériques de GPX3 sont augmentées chez les sujets souffrant de SM et qu'ils présentent une élévation de triglycérides. De plus, les trois sites de la région promotrice de GPX3 (568, 518 et 302) pourraient être considérés comme des marqueurs génétiques utilisables dans une population pour de futures études sur les maladies métaboliques (Baez-Duarte et al., 2014). L'ensemble de ces résultats démontrant l'importance de la sélénoprotéine fonctionnelle pour l'homéostasie physiologique.

3.4 Les sélénoprotéines eucaryotes

Les sélénoprotéines chez les eucaryotes existent sous différentes formes. Elles sont regroupées en grande famille contenant du sélénium sous forme de sélénocystéine. Les membres de cette famille ont des nombreuses fonctions biologiques que seront développées ci-dessous.

3.4.1 Les glutathion peroxydases

Il existe huit glutathion peroxydases (GPX1-GPX8) chez les mammifères, dont cinq sont des sélénoprotéines (GPX1, GPX2, GPX3, GPX4 et GPX6). La GPX1 a été la première sélénoprotéine animale identifiée (Rotruck et al., 1973). C'est également la sélénoprotéine la plus abondante chez le mammifère et qui présente une expression particulièrement élevée dans le foie et les reins. Cette enzyme antioxydante catalyse la réduction de l'hydroperoxyde d'hydrogène en eau dépendante du glutathion (Ren et al., 2002). GPX4 a récemment attiré beaucoup d'attention en raison de sa fonction essentielle. Son inhibition chez la souris, par exemple, entraîne une létalité embryonnaire précoce. De plus, il a été identifié son rôle sur la mort cellulaire programmé dépendant du fer, appelé ferroptose, en régulant les niveaux d'hydroperoxyde phospholipidique (Seiler et al., 2008). Fait intéressant, la forme mitochondriale de cette protéine joue un rôle dans le sperme mature et participe à la formation de liaisons disulfure au cours de la spermiogénèse (Ursini et al., 1999). Alors que GPX1 et GPX4 sont exprimées dans toutes les cellules, l'expression de GPX2 est largement limitée au tractus gastro-intestinal, et la GPX3 est principalement synthétisée dans les reins et sécrétée dans le sang. GPX3 se localise à la membrane de base des tubules proximaux du rein (Olson et

al., 2010) et agit dans le milieu extracellulaire en contrôlant la présence des espèces réactives d'oxygène (Voetsch et al., 2007).

3.4.2 La sélénoprotéine P (Sepp1)

La sélénoprotéine P (Sepp1) est une sélénoprotéine majeure impliquée principalement dans deux rôles : transporter le micronutriment sélénium aux tissus et agir comme un antioxydant cellulaire. Le rôle de transport est assuré par le domaine C-terminal de SEPP1, qui contient 9 résidus de sélénocystéine (Schomburg et al., 2003 ; Hill et al., 2003). Le rôle antioxydant est assuré par une seule sélénocystéine dans un motif redox UXXC au niveau de la portion N-terminale (Burk et al., 2005), un domaine qui a une activité peroxydase (Kurokawa et al., 2014). De plus, l'importance des fonctions de Sepp1 est soulignée par le fait que, même dans des conditions de carence sévères en sélénium, sa production persiste (Burk et al., 2005). En ce qui concerne ses fonctions biologiques dans l'inflammation, des études antérieures ont montré que Sepp1 est régulé négativement dans les cellules de cancers colorectaux (Al-Taie et al., 2004). La fonction antioxydante de Sepp1 suggère également qu'elle pourrait jouer un rôle dans la prévention du cancer, en particulier dans le contexte des cancers inflammatoires caractérisés par une augmentation du stress oxydatif (Dincer et al., 2007). Les dommages induits par le stress oxydatif augmentent dans le contexte d'inflammations chroniques, pour lesquelles le stress oxydatif joue un rôle majeur (Dincer et al., 2007). Ainsi, la sélénoprotéine P régule les voies de signalisation cellulaires et protège les cellules des dommages oxydants. Ces mécanismes ainsi que sa contribution à l'homéostasie cellulaire seront décrits dans le prochain chapitre.

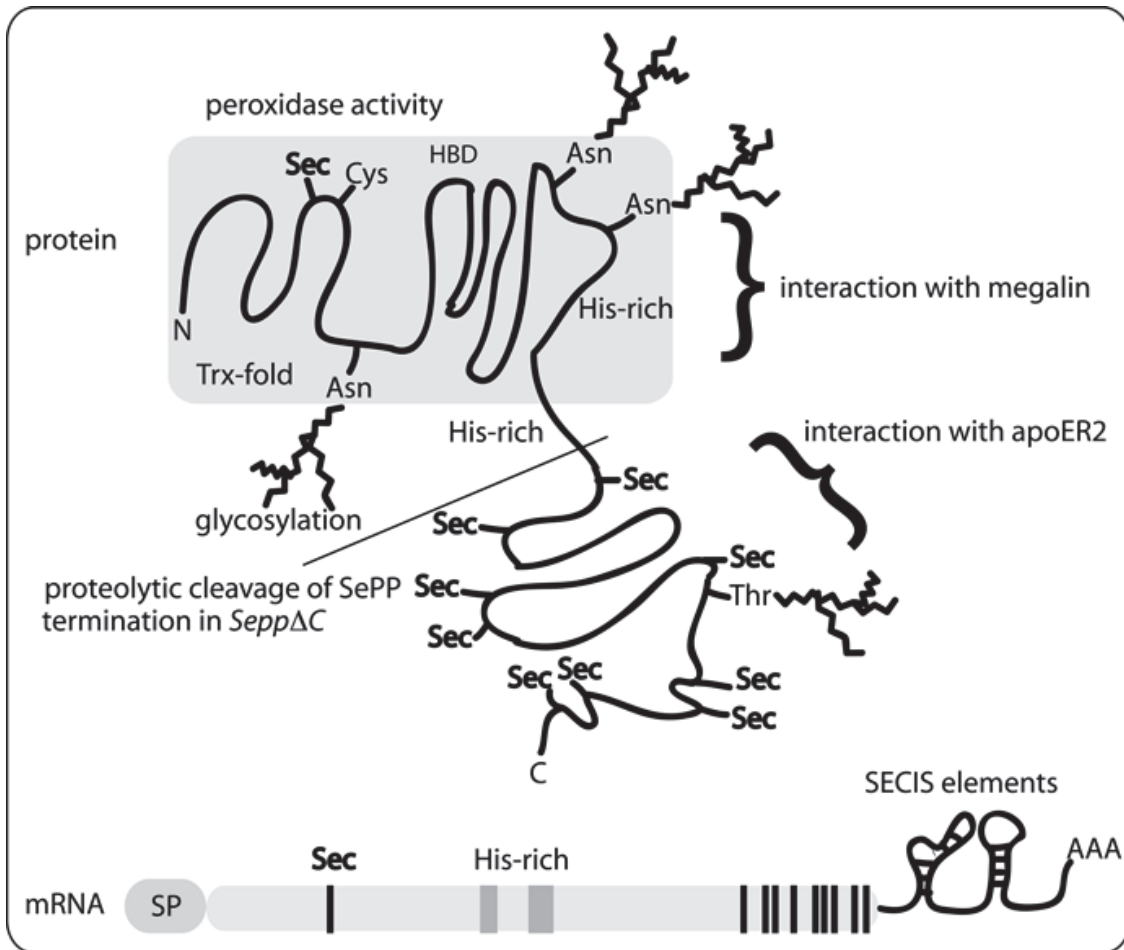


Figure 13 : **Caractéristiques structurales des deux domaines de la sélénoprotéine P** (Hatfield et al., 2016)

Le domaine N-terminal, avec un facteur de thiorédoxine (Trx), contient un motif Sec-X-X-Cys, démontrant une activité peroxydase. Le domaine C-terminal, avec diverses régions Secs, est connu pour sa fonction de transport du sélénium. La protéine sécrétée contient trois sites de N-glycosylation sur l'asparagine (Asn) et un site de O-glycosylation sur la thréonine (Thr) qui sert d'interaction avec ses différents récepteurs (megalin et apoER2). Un domaine de liaison à l'héparine (HBD) a été identifié ainsi que deux domaines riches en Histidine (His), qui pourraient potentiellement être associés à l'interaction avec la matrice extracellulaire. Les isoformes de Sepp1 peuvent résulter d'une glycosylation différentielle, d'un clivage protéolytique ou d'une terminaison de traduction prématurée.

3.4.3 Les thiorédoxines réductases, la sélénoprotéine de 15 kDa (Sel15), la sélénoprotéine M (SELM), les déiodinases de type 1 (DIO1), 2 (DIO2) et 3 (DIO3) et le sélénophosphate synthétase 2 (SPS2)

La forme ancestrale des enzymes glutathions est une protéine contenant la cystéine (Cys) et l'hypothèse actuelle est que Cys a été remplacée par la sélénocysteine (Sec) au cours de l'évolution, ce qui rend ces enzymes de meilleurs catalyseurs. Cependant, d'autres enzymes ont évolué à partir de ces glutathions pour devenir des thiorédoxines. Les trois thiorédoxines réductases (TXNRDs) présentes chez les mammifères sont des sélénoprotéines et le système thiorédoxine (TXN) est dépendant du sélénium. Ces enzymes ont évolué à partir du glutathion réductase (Sun et al., 2001 ; Sun et al., 1999). TXNRD1 est une protéine cytosolique et nucléaire. Sa fonction principale est de maintenir l'état réduit de la TXN1 en réduisant un disulfure dans cette protéine de manière dépendante du NADPH. Un autre membre de la famille thiorédoxine est la thiorédoxine/glutathion réductase (TGR, TXNRD), impliquée dans la formation des liaisons disulfure au cours de la maturation du sperme (Su et al., 2005). Le troisième et dernier membre de la famille, le TXNRD2, est une protéine qui maintient le TXN2 à l'état réduit dans la mitochondrie. De plus, il a été constaté que TXNRD1 et TXNRD2 sont essentiels au développement embryonnaire (Conrad et al., 2004 ; Jakupoglu et al., 2005).

Une autre classe de sélénoprotéines sont les oxydoréductases, comme par exemple la SEP15, un homologue de la SELM, trouvée au réticulum endoplasmique (RE). SEP15 présente également une activité redox (Dilworth et al., 1982). Comme la majorité des sélénoprotéines, l'expression de SEP15 est régulée par la concentration de sélénium dans les tissus (Dilworth et al., 1982).

L'expression de certaines sélénoprotéines telles que la TXNRD1, sont maintenues même à un très faible niveau de sélénium dans l'organisme. Malgré cela, l'expression d'autres sélénoprotéines, comme la SEP15, est réduite dans des conditions de faible sélénium systémique (Self et al., 2000). La Dio1, 2 et 3 sont d'autres sélénoprotéines dépendantes de hautes concentrations de sélénium pour exercer leurs fonctions dans les tissus comme le muscle squelettique (Bocco et al., 2016). Par exemple, les fibres à contraction lente de type I présentent une activité de Dio2 cinq fois supérieures à celle des fibres à contraction rapide de type II (Marsili et al., 2010). En outre, il a été démontré que la génération d'une hormone thyroïdienne appelé triiodothyronine (T3), médiée par la Dio2, est essentielle à la transcription efficace de MyoD, un régulateur de la différenciation myogénique et de la régénération musculaire (Dentice et al. 2010). Malgré le fait que ces sélénoprotéines soient bien décrites sur la

physiologie humaine, il reste encore d'autres qui sont mal caractérisées. C'est le cas de la SPS2 connue seulement pour contribuer à la biosynthèse de sélénoprotéines au niveau transcriptionnel chez les mammifères.

3.4.4 Les sélénoprotéines W (SelW), V (SelV), T (SelT), et H (SelH), O (SelO) et I (SelI)

La sélénoprotéine W a été identifiée chez les eucaryotes et même chez les bactéries. Une étude a identifié sa fonction dans la régulation du calcium dans le muscle squelettique ainsi que dans la différenciation musculaire (Zhang et al., 2015 ; Yao et al., 2016 ; Noh et al., 2010). SELV est exprimée exclusivement dans les testicules. Cependant, sa fonction est encore inconnue (Kryukov et al., 2003). SELT fait partie des premières sélénoprotéines identifiées par la bio-informatique (Kryukov et al., 1999) et SELH a été identifiée pour la première fois dans le noyau des cellules des mouches par sa fonction antioxydante dans ce compartiment cellulaire (Martin-Romero et al., 2001, Kryukov et al., 2003). SelO est une protéine située dans les mitochondries, largement distribuée avec des homologues chez les animaux, les bactéries, les levures et les plantes. Cependant, sa fonction biologique, ainsi que celle de SelI située sur la membrane (Kryukov et al., 2003), n'est pas connue (Han et al., 2014).

3.4.5 Le rôle des sélénoprotéines K (SelK), S (SelS) et N (SepN) dans la biologie cellulaire

SelK et SelS sont des petites sélénoprotéines trouvées dans la membrane du réticulum endoplasmique et impliquées dans l'inflammation et la réponse immunitaire (Fredericks et al., 2014). Par exemple, l'expression de la sélénoprotéine K est nécessaire à l'efficacité du flux de Ca^{2+} dans les cellules cancéreuses du mélanome. De plus, la croissance tumorale et le potentiel métastatique sont dépendants de cette sélénoprotéine. Des rapports récents ont lié SelK à plusieurs partenaires de liaison, notamment la palmitoyl acyltransférase et des composants de la voie de dégradation associée à l'ER (ERAD), tels que Derlin-1, p97 et la sélénoprotéine S (SelS) (Lee et al., 2015 ; Liu et al., 2014). Enfin, SelK intervient dans le flux de Ca^{2+} dans les cellules immunitaires et est la cible des calpaïnes dans les cellules myéloïdes, une classe de protéases impliquées dans la régulation de l'inflammation et la réponse immunitaire. De plus, les fonctions dépendantes du calcium, y compris la prolifération et la migration des lymphocytes T et des neutrophiles, ont été également diminuées (Verma et al., 2011).

La SepN est également située dans la membrane du réticulum endoplasmique et connue pour son rôle dans la biologie musculaire. Une déficience en sélénoprotéine N est à l'origine de

maladies neuromusculaires héréditaires, appelés myopathies liées à SepN, caractérisées par une atrophie musculaire généralisée et une faiblesse musculaire conduisant à une insuffisance respiratoire (Castets et al., 2012). Une étude a aussi démontré que SelN est impliquée dans les mécanismes de la régénération musculaire par la régulation du maintien des cellules souches musculaires adultes (Castets et al., 2011). De plus, au niveau cellulaire, des données récentes suggèrent que SelN participe également à l'homéostasie du calcium en régulant l'activité des récepteurs de la ryanodine (Jurynek et al., 2008).

4. Les effets biologiques de la sélénoprotéine P dans la cellule

4.1 La Sélénoprotéine P comme un antioxydant et un transporteur de sélénium chez les mammifères : un événement remarquable pour la biologie cellulaire

Il a été constaté que Sepp1 isolée du plasma humain protège les lipoprotéines de basse densité (LDL) contre l'oxydation (Traulsen et al., 2003). Dans ce contexte, il convient de mentionner que Sepp1 peut se lier à l'héparine de manière sensible au pH (Arteel et al., 2000). Par conséquent, il a été émis l'hypothèse selon laquelle Sepp1 pourrait se lier aux protéoglycanes situés sur la surface endothéliale vasculaire et contribuer à sa protection contre les oxydants (Arteel et al., 2000). Steinbrenner et collaborateurs ont observé que les cellules prétraitées avec Sepp1 étaient protégées des dommages oxydatifs induits par l'hydroperoxyde de *tert-butyle*. Ce phénomène est le résultat d'une biosynthèse élevée de sélénoenzymes intracellulaires GPx et TrxR (Steinbrenner et al., 2006), ce qui suggère que la Sepp1 absorbée par les cellules traitées peut être impliquée dans la synthèse d'autres sélénoprotéines. En effet, des récepteurs médiateurs de l'absorption cellulaire de Sepp1 ont déjà été identifiés. Par exemple, la forme Sepp1 N-terminale est absorbée dans le tubule proximal rénal par un récepteur appelé mégaline (LRP2). De façon différente, la forme Sepp1 C-terminale est absorbée par un autre récepteur appelé récepteur 2 de l'apolipoprotéine E ou ApoER-2 (Olson et al., 2008 ; Olson et al., 2007). Cette dernière forme, en plus de sa liaison spécifique à son récepteur, a la fonction de transport intracellulaire du sélénium, un minéral important pour la biosynthèse de sélénoprotéines, comme évoqué dans le chapitre précédent.

Cette fonction est très importante parce que la cellule est incapable d'acquérir un apport adéquat du sélénium sans ce transporteur. En effet, l'inactivation de la forme de Sepp1, responsable pour le transport du sélénium, a déclenché une baisse de la concentration de sélénium dans le cerveau des souris (Avery et al., 2018). De plus, ces souris ont développé également des lésions

neurologiques graves et sont décédées lorsque la sélénocystéine lyase a été éliminée simultanément (Pitts et al., 2012). Ainsi, la sélénocystéine lyase protège les neurones du cerveau dans les cas de carence en sélénium induite par déficience de son transporteur, probablement en facilitant la réutilisation de leur sélénium. Le testicule, qui produit et exporte des spermatozoïdes riches en sélénium, présente une expression élevée de l'ARNm d'apoER2. La moelle osseuse et le placenta ont des cellules immunitaires contenant des sélénoprotéines. Le mécanisme par laquelle le placenta capte Sepp1 de la circulation maternelle pour fournir du sélénium au fœtus (Burk et al., 2013) est également médié par l'apoER2. Le cerveau, le muscle squelettique et d'autres tissus ont des quantités modérées de sélénium. En revanche, l'expression de l'ARNm d'apoER2 par le foie et les reins est minime, suggérant un autre mécanisme d'obtention du sélénium par ces tissus. Comme le principal mécanisme de captation intracellulaire du sélénium est médié par la sélénoprotéine P et son récepteur apoER2, l'un des objectifs d'une autre étude était de déterminer la capacité d'une autre sélénoprotéine, la GPX3, à transporter le sélénium. Des expériences *in vivo* ont démontré que la suppression de GPX3 n'avait aucun effet sur la concentration de sélénium dans le foie. Cependant, cette suppression a été capable de réduire la concentration de sélénium dans les reins. Cette réduction de sélénium a été attribuée à un manque de GPX3 dans le rein. Ainsi, aucune preuve n'a été obtenue dans cette étude pour la participation de GPX3 dans le transport du sélénium (Olson et al., 2010). En revanche, dans une autre étude, la délétion de l'apoER2 fœtal a diminué de 51% le sélénium fœtal, ce qui a permis de vérifier le fonctionnement du mécanisme de transport du sélénium placentaire *via* Sepp1-apoER2. Par contre, la suppression de GPX3 de la mère a diminué de 13% le sélénium fœtal, mais uniquement dans des conditions de déficit en sélénium, suggérant l'existence d'un mécanisme supplémentaire de transport du sélénium entre la mère et le fœtus par la GPX3 (Burk et al., 2013).

4.2 La sélénoprotéine P dans l'inflammation sur la régulation et fonctions cellulaires immunitaires

Le rôle de la sélénoprotéine P dans le système immunitaire reste encore mal compris. Cependant, des travaux récents ont démontré son impact sur des macrophages dans un contexte inflammatoire. Ainsi, il a été vérifié qu'à partir d'un modèle de maladie intestinale inflammatoire, les défenses antioxydantes ont été compromises en raison de carences nutritionnelles. Le fait que la sélénoprotéine P soit connue pour sa fonction de transporter le micronutriment sélénium vers les tissus cibles a permis l'hypothèse concernant la fonction de

Sepp1 et l'immunité. En effet, chez la souris Sepp1 muté qui présente un déficit du transport du sélénium, l'expression de gènes cibles de macrophages M2 a été modulée, suggérant un rôle de cette sélénoprotéine dans la polarisation des macrophages et la fonction immunitaire (Barrett et al., 2015). De plus, le sélénium semble agir sur l'activation des macrophages et la phagocytose pour la destruction de la bactérie *S. aureus*, ce qui suggère qu'une carence nutritionnelle de ce minéral pourrait entraîner une perte d'activité bactéricide des macrophages (Aribi et al., 2015). Une autre étude évaluant les phénotypes des macrophages dans l'environnement tumoral a montré que les macrophages anti-inflammatoires ainsi que les macrophages associés aux tumeurs (TAM) expriment le gène Sepp1 de façon très élevée, suggérant un rôle de cette sélénoprotéine dans différents phénotypes de macrophages anti-inflammatoires (Solinas et al., 2010). Carlson et collaborateurs ont également démontré l'expression des sélénoprotéines dans les macrophages à l'état basal. De plus, les niveaux d'espèces réactives d'oxygène chez les macrophages dépourvus en sélénoprotéines sont plus élevés par rapport au contrôle, ce qui suggère une importante fonction antioxydante de Sepp1 afin de maintenir l'homéostasie redox des macrophages. De façon intéressante, ces auteurs ont vérifié une réduction de l'activité migratoire de ces macrophages invalidés pour *sepp1*, probablement due à la baisse expression des gènes de la matrice extracellulaire (Carlson et al., 2009). De plus, la technique de séquençage de l'ARN (RNA-Seq et single-cell RNA-Seq) a également permis la détection d'une forte expression du gène *sepp1* dans les macrophages des souris athérosclérotiques (Cochain et al., 2018), renforçant l'importance de cette sélénoprotéine pour le système immunitaire dans l'inflammation.

4.3 La sélénoprotéine P et le système musculaire

4.3.1 Contributions biologiques de la sélénoprotéine P à la physiologie du muscle squelettique et ses voies de signalisation

Le rôle biologique des sélénoprotéines, principalement la SelN, dans les cellules du muscle squelettique a été étudié ces dernières années. Cependant, il reste à élucider les mécanismes physiologiques de Sepp1.

La *sepp1* est l'un des gènes les plus exprimés dans des myoblastes primaires isolés de muscles en régénération (Dell'Orso et al., 2019). En outre, il a été démontré que les myoblastes utilisent la Sepp1 du milieu pour la synthèse d'une autre sélénoprotéine, la glutathion peroxydase. Le mécanisme intracellulaire auquel la Sepp1 utilise pour transporter le sélénium à ces myoblastes

est dépendant du récepteur ApoER2. De plus, des expériences ont montré que l'inhibition de l'apoER2 et de Sepp1 inhibait également le transport du sélénium et l'activité de la GPX totale, respectivement, soulignant le fait que le récepteur ApoER2 soit crucial pour l'absorption de la Sepp1 et l'importance de la Sepp1 pour la fonction de la glutathion peroxydase (Kurokawa et al., 2012).

En outre, des quantités accrues de Sepp1 circulantes ont été corrélées à l'inefficacité de l'entraînement sur la capacité d'endurance chez l'homme, suggérant que les inhibiteurs de l'axe Sepp1-ApoER2 pourraient agir comme médicaments améliorant l'exercice pour traiter les maladies métaboliques associées à un style de vie sédentaire (Misu et al., 2017). Une autre étude a démontré que l'administration de Sepp1 altère la signalisation de l'insuline dérégulant le métabolisme de glucose dans les myocytes tandis que sa suppression génétique a été capable d'améliorer la sensibilité systémique à l'insuline et la tolérance au glucose chez la souris (Misu et al., 2010). En outre, la Sepp1 régule également l'AMPK par inhibition de sa phosphorylation dans le muscle (Steinbrenner et al., 2013) et son expression est augmentée 5 jours après une lésion induite par cardiotoxine, suggérant un rôle de la Sepp1 au cours de la différenciation musculaire (Castets et al., 2011).

4.3.2 Le paradoxe du profil antioxydant de la sélénoprotéine P

Le rôle antioxydant de la Sepp1 dans le muscle squelettique a été étudié jusqu'au présent (Lei et al., 2016). Cependant, récemment il a été mis en évidence un rôle négatif de ce profil antioxydant. En effet, il a été démontré que la fonction antioxydante de la Sepp1 empêche la résistance à l'effort physique dans un modèle d'exercice. Le mécanisme d'action est médiée par un nouveau récepteur de la Sepp1 dans le muscle, le récepteur de lipoprotéine de basse densité (LRP1). Les souris dépourvues de Sepp1 présentaient une faible expression de LRP1 et un phénotype de gain de performance après un entraînement physique. De façon intéressante la production de ROS augmentait au même temps que le gain de force, suggérant que la signalisation oxydative induite par le ROS est bénéfique au phénotype de force musculaire et ne peut pas être complètement réduite par des anti-oxydants (Misu et al., 2017). Dans ce contexte, un traitement avec une forte concentration de ROS, comme le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), a réduit la phosphorylation d'Akt (connue comme un signal transducteur de l'insuline) par l'activation de JNK, tandis qu'une baisse de la concentration d' H_2O_2 a activé la phosphorylation d'Akt par suppression de l'activité de la PTP1B, démontrant que la production de ROS peut exercer un effet positif ou négatif sur la signalisation de l'insuline selon sa

concentration (Seale et al., 2015). Ces résultats suggèrent que la Sepp1 agit comme un antioxydant, et que la modulation de ces espèces réactives d'oxygène requises pour cette signalisation peut causer la résistance à l'insuline. De façon similaire, il a été rapporté que les souris déficientes pour les glutathions peroxydases ont été protégées de la résistance à l'insuline induite par un régime riche en graisses, soulignant l'importance de ne pas réduire complètement le stress cellulaire médié par les ROS (Merry et al., 2016).

Sepp1 peut agir comme une protéine antioxydante *via* l'activation des glutathions peroxydases, contenant du sélénium dans sa structure comme cela a été mentionné dans les chapitres précédents. Dans ce contexte, une étude a suggéré que la supplémentation de sélénium a été associée à l'augmentation du risque de développement du diabète.

5. Le contrôle des espèces réactives d'oxygène et les effets antioxydants de la glutathion peroxydase 3

Les niveaux de production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) intracellulaires peuvent être modifiés par des paramètres critiques, notamment l'oxygénation, la disponibilité du glucose et les facteurs de croissance. L'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$), un exemple d'espèce réactive de l'oxygène a plusieurs sources cellulaires. Il s'agit d'un sous-produit naturel de la chaîne de transport d'électrons dans les mitochondries, faisant partie de l'oxydation du glucose ou des acides gras. Il est également produit par des oxydases associées à la membrane, telles que la NADPH oxydase, ainsi que par le réticulum endoplasmique et les oxydases peroxysomales (Lassègue et al., 2009). Normalement, le superoxyde est converti en H_2O_2 par les enzymes superoxyde dismutase (SOD). Le H_2O_2 peut ensuite être converti en H_2O par des enzymes comme les GPX (Le Moal et al., 2017). Ces enzymes utilisent le glutathion pour convertir le H_2O_2 en H_2O , produisant ainsi du glutathion oxydé (GSSG). H_2O_2 est également généré dans le cadre de la signalisation de nombreuses hormones, notamment l'insuline (Krieger-Brauer et al., 1992) ainsi que des cytokines telles qu'IL-6 et $TNF\alpha$ (Finkel et al., 2011). L'origine des ROS peut moduler les voies physiologiques dans un cadre d'homéostasie ou de pathologie. Dans des états pathologiques, il est suggéré que la combinaison d'une oxydation continue des substrats énergétiques et d'une dérégulation de nombreuses voies de signalisation submerge le système antioxydant, entraînant un stress oxydatif (Brownlee et al., 2001). Des ROS excessives peuvent entraîner une dysfonction cellulaire par le biais de mécanismes directs (l'activation ou inhibition de voies de signalisation cellulaires) et indirects (modification de protéines, de lipides ou d'ADN, par exemple). Les preuves de cette hypothèse proviennent de nombreuses études

d'association chez des humains obèses, démontrant des corrélations positives entre les marqueurs systémiques du stress oxydatif et l'indice de masse corporel (Furukawa et al., 2004). De plus, il a été démontré que la production de ROS joue un rôle clé dans la médiation de la résistance à l'insuline induite par le TNF α et les glucocorticoïdes dans les adipocytes (Houstis et al., 2006). Des signes de stress oxydatif sont également présents aux stades plus avancés des maladies métaboliques, comme par exemple la stéatose non alcoolique (Roskams et al., 2003) et l'athérosclérose (Ohara et al., 1993). Il n'est donc pas surprenant qu'une théorie de détérioration métabolique induite par le stress oxydatif ait retenu l'attention. Une question centrale liée à la GPX est de savoir si sa fonction est plus importante dans les états physiologiques normaux ou dans la protection contre le stress oxydatif en cas de maladie. La glutathion peroxydase plasmatisque (GPX3) est la seule isoforme antioxydante extracellulaire des sélénoprotéines et le rein présente le plus haut niveau d'expression de l'ARNm de GPX3. Il a également été démontré que des patients anéphriques (sans rein) présentaient des niveaux d'activité de la GPX3 plasmatisque significativement inférieurs à ceux des témoins sains suggérant que le rein est la principale source de GPX3 (Freedman et al., 1995) et que l'activité de la GPX3 plasmatisque est corrélée à une adéquate fonction rénale. En tant que protéine sécrétée, GPX3 est proposée comme un régulateur majeur des ROS extracellulaires dans le système vasculaire (Ottaviano et al., 2009) en préservant la biodisponibilité de l'oxyde nitrique (NO) et en favorisant un environnement anti-thrombotique. Dans ce contexte, des études ont montré qu'un déficit en GPX3 entraînait une activation accrue des plaquettes et un risque d'accident vasculaire cérébral et thrombose (Jin et al., 2011 ; Pang et al., 2018), renforçant le rôle de la GPX3 dans le maintien de l'homéostasie vasculaire.

Un autre tissu cible des interventions de la GPX3 est le muscle squelettique. Dans un modèle *in vitro*, il a été démontré que l'acide rétinoïque contribue à l'activité de l'aldéhyde déshydrogénase, connu pour oxyder les produits provenant de la peroxydation lipidique dans les myoblastes dystrophiques. De plus, la GPX3 a été identifiée comme un gène sensible aux rétinoïdes régulant ses effets antioxydants dans les myoblastes humains, ce qui apporte de nouvelles informations sur la manière dont les myoblastes orchestrent leur propres protections (Haddad et al., 2012). Les myotubes expriment également la GPX3 et, dans ces cellules, il semble avoir un effet sur le récepteur alpha aux estrogènes. En effet, une étude a montré que l'inactivation de ce récepteur a réduit l'expression de GPX3 ainsi que son activité redox. Par contre un remplacement par l'hormone estradiol a été capable d'augmenter son expression dans le muscle squelettique (Baltgalvis et al., 2010). Dans ce contexte, le niveau d'expression de GPX3 est plus élevé chez la femme par rapport à l'homme (Borras et al., 2007) et est associé à

la résistance à l'insuline (Chung et al., 2009) et à l'obésité (Yang et al., 2009). L'activité redox des sélénoprotéines dans la thyroïde peut également contribuer aux dommages causés par l' H_2O_2 . Une étude a montré que l'ARNm de GPX3 était exclusivement localisé dans les thyrocytes, présentait les niveaux d'expression les plus élevés par rapport aux témoins et était régulé négativement dans le cancer de la thyroïde.

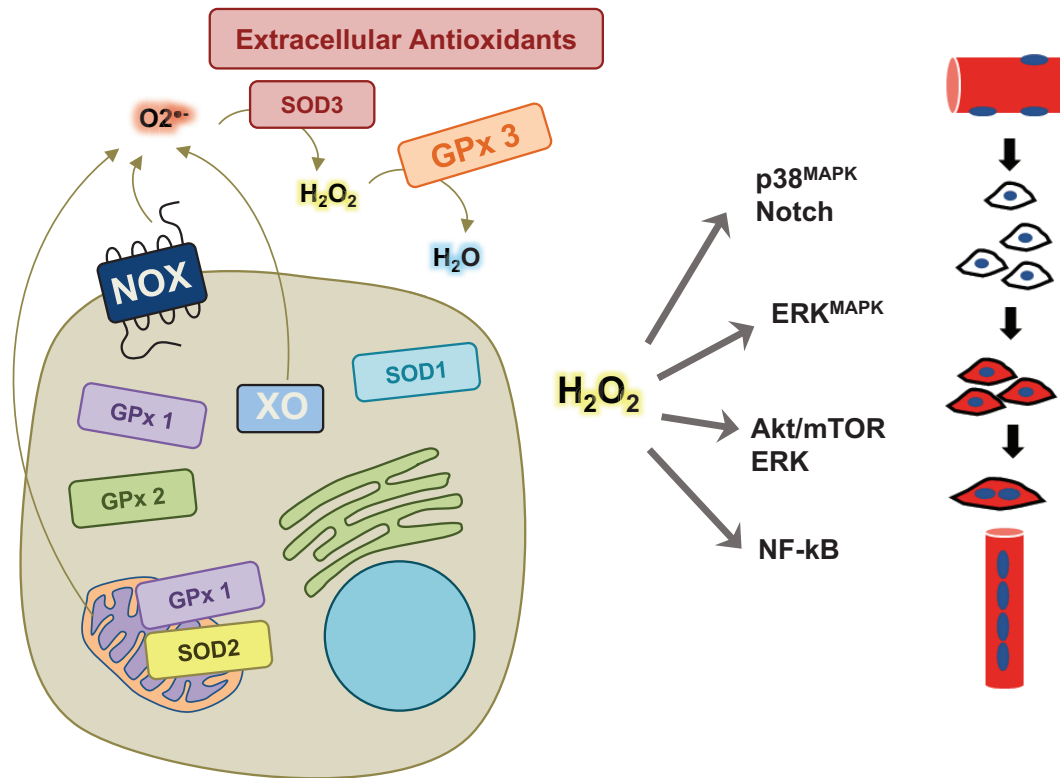


Figure 14 : La glutathion peroxydase 3 agissant comme un antioxydant

(Adapté de Le Moal et al., 2017)

La glutathion peroxydase 3 extracellulaire transforme le peroxyde d'hydrogène en eau. Cette étape est importante pour le contrôle de la prolifération et de la différenciation cellulaire médiées par l'activation de plusieurs voies de signalisation comme la p38, la Notch, l'ERK, l'Akt, la mTOR et la NF- κ B qui sont régulées par les espèces réactives d'oxygène (ROS). Ainsi, un déséquilibre de production de ROS peut perturber l'homéostasie cellulaire.

6. La prolifération et la différenciation cellulaire en réponse à la Sepp1 et la GPX3

Des travaux ont évalué les effets de SEPP1 sur la prolifération des cellules de carcinomes rénaux humains. Dans les cellules sur-exprimant SEPP1, le cycle cellulaire a été arrêté en phase G2/M et par conséquent la capacité de prolifération cellulaire a été inhibée (Liu et al., 2016). De plus, SEPP1 possède des propriétés d'interaction à l'héparine (Arteel et al., 2000), agissant en compétition avec le VEGF. La SEPP1 est associée à la prolifération des cellules endothéliales (Burk et al., 1997), ce qui suggère qu'elle exerce certaines actions sur les cellules endothéliales vasculaires ou sur l'angiogénèse. Ainsi, il a été vérifié que cette sélénoprotéine contribue à l'inhibition de l'angiogénèse dans le diabète de type 2. Il a été démontré que la SEPP1 atténue la transduction du signal du VEGF dans les cellules endothéliales vasculaires, ce qui entraîne la suppression de la prolifération cellulaire, de la migration et de la formation de vaisseaux induits par le VEGF (Ishikura et al., 2014). En ce qui concerne la différenciation cellulaire des préadipocytes, le traitement au TNF α ou avec de l'H₂O₂ a réduit l'expression du gène *sepp1*. Ce phénomène a entraîné une réduction de l'activité de la glutathion peroxydase totale et des cytokines inflammatoires MCP-1 et IL-6. Ces cytokines ont inhibé l'adipogénèse ainsi que la différenciation normale des adipocytes 3T3-L1 *via* la modulation du stress oxydatif et de la réponse inflammatoire (Zhang et al., 2011).

De plus, une étude a examiné l'effet de la signalisation redox médiée par la GPX3 sur la voie de la kinase Erk et a montré que GPX3 inhibait l'activation de la cascade de signalisation Erk/NF- κ B/cyclineB1 en protégeant la MKP3 (une phosphatase spécifique de Erk) des effets du ROS, démontrant ainsi que la prolifération cellulaire peut être inhibée par la GPX3 médiée par des signaux d'oxydo-réduction (An et al., 2018). Dans ce contexte, il a été démontré, dans des fibroblastes cardiaques, que l'activation de l'AMPK avec l'AICAR a inhibé la synthèse de l'ADN des fibroblastes, le nombre de cellules ainsi que la modulation des cellules en phase S impliquant leur prolifération et leur croissance. Ces effets ont été médiés par ERK et AMPK qui a réprimé l'activation de la p70S6K, suggérant un *crossstalk* entre les deux kinases. C'est la première démonstration que l'AMPK pourrait être une cible d'ERK dans la prolifération induite par les facteurs de croissance, ce qui pourrait donner naissance à un nouveau mécanisme que les facteurs de croissance utilisent pour favoriser la prolifération des fibroblastes cardiaques (Du et al., 2008). Il a été démontré également que les ROS sont capables d'activer ces deux kinases par l'oxydation des cystéines qui sont présentes sur ces protéines. Par exemple, la signalisation de ROS inactive la *dual-specific phosphatase 3* (DUSP3) par l'oxydation de la cystéine 124 provoquant une activation de ERK (Zhang et al., 2016). Dans le cas de l'AMPK,

les cystéine 299 et 304 sont oxydées par le peroxyde d'hydrogène (Morales-Alano and Calbet 2016), ce qui suggère que la GPX3 peut réguler la prolifération et la différenciation cellulaire par le contrôle des cystéines des protéines kinases.

Objectifs de la thèse

Les macrophages contribuent à la régénération du muscle squelettique en promouvant la myogenèse grâce à leur plasticité qui leur permet d'acquérir différents phénotypes. Les macrophages pro-inflammatoires sont capables de stimuler la prolifération des précurseurs myogéniques (*i.e.* les myoblastes) alors que les macrophages anti-inflammatoires soutiennent leur fusion. En effet, par exemple, il a été démontré que les macrophages pro-inflammatoires sécrètent des cytokines comme les interleukines 6 et 1, qui régulent négativement la différenciation des précurseurs myogéniques (Arnold et al., 2007). En revanche, le facteur de différenciation de croissance-3 (GDF3) sécrété par les macrophages anti-inflammatoires induit la fusion de myoblastes agissant sur la formation de nouveaux myotubes et par conséquent sur l'homéostasie musculaire (Varga and Mounier et al., 2016).

Afin d'identifier d'autres molécules sécrétées par les macrophages et d'étudier leurs effets sur la myogenèse, un transcriptome a été réalisé sur des macrophages humains activés par les cytokines IFN γ ou IL10 afin d'obtenir respectivement un phénotype pro et anti-inflammatoire. L'analyse bio-informatique des gènes plus exprimés par les macrophages anti-inflammatoires par rapport aux macrophages pro-inflammatoires a permis d'identifier des molécules potentiellement sécrétées (protéines porteuses du peptide signal de sécrétion) de façon plus importante par ces macrophages anti-inflammatoires.

Parmi ces candidats, notre équipe a pu montrer que la sélénoprotéine P (Sepp1) et la glutathion peroxydase 3 (GPX3) sont environ 5 fois plus exprimées par les macrophages anti-inflammatoires par rapport aux macrophages pro-inflammatoires. De plus, l'expression réduite de ces gènes par ARN interférents dans des cellules musculaires humaines inhibe la fusion cellulaire (données non publiées). Ces molécules peuvent non seulement réguler les étapes de la myogenèse en agissant directement sur les cellules musculaires, mais elles peuvent aussi moduler le phénotype des macrophages et par conséquent la résolution de l'inflammation au cours de la régénération du muscle squelettique.

Ainsi l'objectif principal, de ma thèse (étude#1) a été d'étudier le rôle des sélénoprotéines Sepp1 et GPX3 dans le phénotype des macrophages lors de l'inflammation stérile au cours de la régénération musculaire.

Comme un objectif secondaire (étude#2), nous avons étudié le rôle trophique des polymères mimétiques Heparan Sulfate (RGTA), dans la résolution de l'inflammation musculaire (Bouviere and Trignol, 2019). Comme la Sepp1 et la GPX3 sécrétés par les macrophages sont capables de soutenir la myogenèse, le but de cette seconde étude était de déterminer si le traitement avec une troisième molécule, RGTA, peut également agir sur les étapes de la

myogenèse lors de la régénération du muscle squelettique. Ces deux études ont permis d'évaluer le rôle des molécules qui interagissent avec le microenvironnement et contribuent à la régénération musculaire.

Dans ces deux études, une mesure de la taille de la myofibre a été réalisée pour évaluer l'efficacité de la régénération des muscles squelettiques. La mesure de la taille de myofibre est actuellement effectuée manuellement. Ainsi, dans une troisième étude (#3), nous avons développé et validé une macro sur le logiciel ImageJ afin de mesurer de manière semi-automatique la taille de la myofibre. Ce nouvel outil a été utilisé pour les études #1 et #2.

Étude #1

Matériels et Méthodes

CONSTRUCTION DES MODÈLES ANIMAUX

La sélénoprotéine P (Sepp1) a deux domaines distincts. Le domaine N-terminal possède une seule sélénocystéine, dans un motif rédox, de type thiorédoxine capable d'agir comme un antioxydant cellulaire. Le domaine C-terminal a 9 sélénocystéines et possède la fonction de transporteur de sélénium pour les tissus. Afin d'évaluer les différentes fonctions de cette protéine nous disposons des souris génétiquement modifiées, qui ont été élaborés par Raymond Burk aux États-Unis. Le modèle génétique de la sélénoprotéine glutathion peroxydase 3 a été également obtenu grâce à la collaboration avec Raymond Burk. Les souris ont été mis en accouplement à l'animalerie ALECS (module SPF) placée à Lyon, afin d'obtenir le nombre nécessaire des mâles (n = 3 minimum pour chaque expérience).

Construction des modèles murins Sepp1^{-/-} et GPX3^{-/-} : l'obtention de souris invalidées pour ces gènes de façon constitutive et ubiquitaire a été réalisée grâce à l'inactivation du gène *sepp1* ou du gène *gpx3* (Burk et al., 2009).

Construction du modèle murin Sepp1^{U40S/U40S} : La sélénocystéine placée en position 40 sur l'extrémité N-terminale a été remplacée par une sérine, causant la perte de l'activité rédox de la thiorédoxine. Cependant, le transport du sélénium reste intact (Kurokawa et al., 2014).

Construction du modèle murin Sepp1^{Δ240-361} : L'extrémité C-terminal a été tronquée (aa240-361) en préservant les acides aminés 1-139. Malgré l'effet de la perte du transport du sélénium, l'activité redox reste intacte (Hill et al., 2007).

Construction du modèle murin LysM^{Cre/+}Sepp1^{fl/fl} : Pour étudier la fonction de la Sepp1 dans les macrophages chez la souris adulte, une stratégie affinée d'inactivation génique conditionnelle a été mise au point, reposant sur l'ADN recombinase Cre et ses sites de reconnaissance (loxP). Pour la mutagenèse conditionnelle, le gène cible *sepp1* a été modifié par l'insertion de deux sites loxP qui permettent d'exciser le segment du gène flanqué (floqué) par une recombinaison induite par la Cre. La recombinase Cre est exprimée sous le contrôle du promoteur du lysozyme M (*LysM*), activé spécifiquement dans les cellules appartenant à la lignée myéloïde. La recombinase Cre est donc exprimée dans les cellules de la lignée myéloïde où elle engendre la délétion du gène *sepp1* flanqué de séquences loxP.

Nous avons utilisé le génotype C57/BL6 (wild-type) comme le contrôle des modèles murins Sepp1^{-/-}, GPX3, Sepp1^{U40S/U40S}, Sepp1^{Δ240-361}. Le génotype LysM^{+/+}Sepp1^{fl/fl} a été utilisé comme le contrôle du modèle murin LysM^{Cre/+}Sepp1^{fl/fl}.

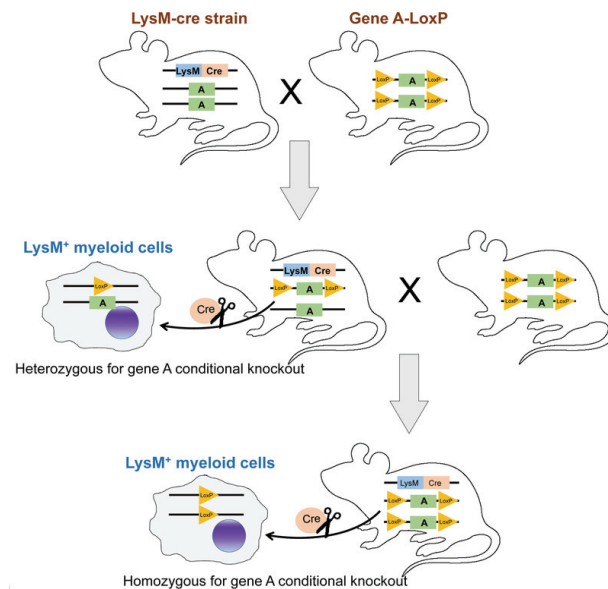


Figure 1 : Génération de souris KO conditionnelles spécifiques aux cellules LysM⁺ utilisant la technologie Cre/loxP (Shi et al., 2018)

La souris transgénique LysM-Cre est d'abord croisée avec la souris homozygote pour le gène cible (A) flanqué de loxP. Dans cette génération, le gène A est un knock-out hétérozygote spécifique des cellules LysM⁺. Un autre croisement de cette génération avec les souris parentales homozygotes pour le gène A flanqué de loxP conduira à la génération d'environ 25% d'homozygotes pour le gène A flanqué de loxP et hémizyote/hétérozygote pour le transgène Cre. Dans cette génération, l'excision médiée par la recombinase Cre provoque l'inactivation homozygote du gène A spécifiquement dans les cellules LysM⁺.

LES EXPÉRIENCES AVEC LES MODÈLES ANIMAUX

Les expériences ont été effectuées sur des souris GPX3^{-/-} (perte de l'activité antioxydante); Sepp1^{-/-} (perte de l'activité peroxydase et du transport du sélénium); LysM^{+/+}Sepp1^{fl/fl}; LysM^{Cre/+}Sepp1^{fl/fl} (absence de Sepp1 dans les macrophages); Sepp1^{U40S/U40S} (perte de l'activité peroxydase) et Sepp1^{A240-361} (perte de l'activité du transport du sélénium) adultes mâles âgées de 8 à 16 semaines et conformément à la législation française. Pour les expériences de régénération musculaire, les souris ont été anesthésiées avec de l'isoflurane et le muscle *Tibialis Anterior* (TA) a été injecté avec de la cardiotoxine (Latoxan) à 12 μ M (50 μ l par muscle). Les muscles ont été prélevés à différents moments après la lésion induite par la cardiotoxine (1, 2, 3, 4, 8 et 28 jours après la lésion).

ANALYSE HISTOLOGIQUE ET IMMUNOMARQUAGE *IN VIVO*

Une fois prélevés, les muscles TA ont été mis sur un morceau de liège et fixés avec de la gomme adragante avant d'être congelés dans de l'isopentane refroidi avec de l'azote liquide. Les muscles ont été conservés à -80°C. Ensuite, il a été réalisé des coupes transversales d'une épaisseur de 10 µm (cryomicrotome (NX50, Microm)), qui ont été également maintenues à -80°C. Les coupes de muscles ont été colorés avec une coloration hématoxyline/éosine afin de vérifier si les muscles avaient au moins 90% de leur surface avec des myofibrilles en régénération (c'est-à-dire, avec des noyaux centraux). Afin de détecter la présence de lipides, une coloration avec du noir Soudan a été effectuée. Les coupes ont été déshydratées dans de l'éthanol à 70% pendant 10 secondes, colorées dans une solution noir Soudan (#199664-25G, Sigma-Aldrich) pendant 2 heures, Hemalun (MHS80, Sigma-Aldrich) pendant 1 min et montées avec le milieu de montage Fluoromount-G (#FP-483331, Interchim). Pour les expériences d'immunofluorescence, les lames ont été incubées avec du Triton 0,5% pendant 10 minutes puis lavées 3 fois avec une solution saline de phosphate (PBS). Ensuite, elles ont été incubées avec l'albumine de sérum bovin (BSA) à 2% pendant 1 heure à température ambiante, lavées rapidement 1 fois avec du PBS et incubées avec un anticorps anti-laminine de lapin à 1:200 (#L9393, Sigma-Aldrich). Les lames ont été lavées trois fois avec du PBS et incubées avec des anticorps secondaires (Tableau 1). Les coupes ont été incubées pendant 10 secondes dans une solution Hoechst à 1:1000 (#B2261, Sigma-Aldrich) et lavées une fois avec du PBS avant d'être montées avec le milieu de montage Fluoromount G (#FP-483331, Interchim). Les lames ont été stockées à 4°C à l'abri de la lumière jusqu'à l'acquisition des images. Tous les échantillons de la même expérience ont été enregistrés dans des conditions similaires (microscope, grossissement, temps d'exposition et échantillonnage). Pour l'analyse de la section musculaire entière, les diapositives ont été automatiquement numérisées à x10 ou x20 de grossissement à l'aide d'un microscope (Axio Observer.Z1, Zeiss) connecté à une caméra (CCD CoolSNAP HQ2) à l'aide du logiciel Metavue. Toute la section musculaire a été automatiquement reconstituée par le logiciel Metavue. L'analyse de la coupe entière, de façon semi-automatique a été réalisée à l'aide de la macro Open-CSAM ImageJ (Desgeorges et al., 2019).

EXTRACTION ET ISOLEMENT DES MACROPHAGES A PARTIR DU MUSCLE SQUELETTIQUE PAR FACS

Les muscles TA ont été disséqués, digérés dans un milieu DMEM (#11995065, Gibco) contenant 2 mg/ml de collagénase B (#11088807001, Roche Diagnostics GmbH) à 37°C pendant 1 heure. Ensuite, les cellules ont été filtrées (Miltenyi Biotec - 30 µm) et les récepteurs

Fc bloqués avec le réactif de blocage (#130059901, FcR Blocking Reagent Miltenyi Biotec) pour éviter la fixation du fragment Fc des immunoglobulines aux récepteurs pendant 20 min à 4°C dans du PBS à 2% de sérum de veau fœtal (#10270-106, SVF - Gibco, Thermofisher scientific). Puis, les cellules ont été marquées avec des anticorps anti- CD45 (#25-0451-81, eBioscience) afin d'obtenir la population de monocytes provenant de progéniteurs médullaires présents dans le sang. Ensuite, pour l'obtention de la population de macrophage, les cellules ont été marquées avec CD64 ou également appelé récepteur de surface FcγRI (#558539, BD PharMingen) ainsi qu'avec Ly6C (#12-5932-82, eBioscience) pour différencier la population de macrophages pro-inflammatoires (Ly6C⁺) de la population de macrophages anti-inflammatoires (Ly6C⁻) conjugués à l'APC pendant 30 min à 4°C. Les macrophages ont été analysés avec un cytomètre de flux (FACSCanto II, BD Biosciences).

CULTURE DE MACROPHAGES DERIVES DE LA MOELLE OSSEUSE

Les macrophages ont été obtenus à partir de précurseurs de la moelle osseuse comme décrit précédemment (Mounier et al. 2013). L'isolation a été réalisée chez des souris en rinçant la moelle du fémur et du tibia avec un milieu de culture DMEM (#11995065, Gibco). La moelle osseuse extraite a été cultivée dans 48% de DMEM en glucose (4,5g/L) et en pyruvate (110mg/L) (#11995065, Gibco), 20% de sérum de veau fœtal (#10270-106, SVF, Gibco, Thermofisher scientific), 30% du surnageant des cellules apellées L929 (qui sécrètent GM-CSF, le facteur de différenciation de macrophages), 1% d'antibiotique pénicilline/streptomycine (PS) (#15140-122, Gibco.), 1% de fongicides (#15290-026, Gibco) pendant 5 à 7 jours. Le milieu conditionné L929 a été obtenu après 7 jours de culture de cellules L929 avec du DMEM (#11995065, Gibco) contenant 10% de SVF (#10270-106, SVF, Gibco, Thermofisher scientific).

POLARISATION DES MACROPHAGES ET IMMUNOMARQUAGE *IN VITRO*

Les macrophages ont été ensemencés à 200 000 cellules/puits dans des plaques 12 puits (3,5cm²) en utilisant du DMEM contenant 10% de SVF et 1% PS sur des lamelles de verre dans des plaques à 12 puits. Six heures après l'adhésion, ces cellules ont été traitées avec la cytokine interféron gamma (IFNγ) à 1μg/mL (#485-MI-100, RD systems, l'interleukine 4 (IL4) à 2μg/mL (#404-ML-010, RD systems) ou l'interleukine 10 (IL10) à 2μg/m (#417-ML-005, RD systems). Puis, les cellules sont cultivées dans du DMEM à 10% de SVF avec les cytokines pendant 3 jours. Après traitement, les cellules ont été fixées avec du paraformaldehyde (PFA)

à 4% pendant 10 minutes puis lavées avec du PBS. Ensuite, elles ont été perméabilisées pendant 10 minutes avec du Triton à 0,5% et lavées avec du PBS. Les antigènes non spécifiques ont été bloqués pendant 1 heure avec 4% de BSA avant l'immunomarquage pour CCL3 à 1:50 (#sc-1383, Santa Cruz), iNOS à 1:50 (#ab3523, Abcam), CD206 à 1:50 (#sc-58987, Santa Cruz), CD163 à 1:50 (#sc-33560, Santa Cruz) à 4°C pendant la nuit. Ensuite, les cellules ont été incubées avec les anticorps secondaires conjugués à la cyanine 3 (#712-165-153, cy3 - Jackson ImmunoResearch) ainsi que le FITC *Fraction Monoclonal Mouse Anti-Fluorescein* (#711-095-152, FITC – Jackson ImmunoResearch). Tous les échantillons de la même expérience ont été enregistrés dans des conditions similaires (microscope, grossissement, temps d'exposition et échantillonnage). Au moins 10 images par condition ont été acquises à un grossissement de X20 en utilisant un microscope (Axio Imager.Z1, Zeiss) connecté à une caméra photométrique (CoolSNAP MYO CCD) à l'aide d'un logiciel d'analyse (MetaMorph Software). La quantification des marqueurs de macrophages a été effectuée par quantification manuelle sur le logiciel ImageJ.

COCULTURE : LE MILIEU CONDITIONNE DE MACROPHAGES ET LES PRECURSEURS MYOGENIQUES (MPC)

Les macrophages ont étéensemencés à 200 000 cellules/puits dans des plaques à 12 puits (3,5cm²) dans du DMEM à 10% de SVF et 1% de PS. Ils ont été traités pendant 3 jours avec de l'IFN γ à 1 μ g/mL (#485-MI-100, RD systems), de l'IL4 à 2 μ g/mL (#404-ML-010, RD systems) ou de l'IL10 à 2 μ g/m (#417-ML-005, RD systems). Ensuite, les cellules ont été lavées 3 fois avec du PBS. Puis, 1mL du milieu DMEM avec 1% de PS sans SVF a été ajouté pendant 24 h pour obtenir le milieu conditionné des macrophages. Les macrophages ont été obtenus à partir de muscles TA et ont été cultivés dans du DMEM/F12 contenant 20% de SVF et 2% de facteurs de croissance (UltrosorG, Pall Inc), comme décrit précédemment (Mounier et al., 2013). Pour les études de prolifération, les MPC ont étéensemencés dans des plaques 2 puits (#055069, labteks 2 puits) (4,2cm²) à 10 000 cellules/cm² sur Matrigel (1:10) et incubés pendant 1 jour avec le milieu conditionné des macrophages contenant 2,5% de SVF. Ensuite, les MPC ont été fixés avec de la PFA à 2% pendant 10 minutes et lavés avec du PBS. Puis, ils ont été perméabilisés pendant 10 minutes avec du Triton à 0,5% et lavés encore une fois avec du PBS. Les antigènes non spécifiques ont été bloqués pendant 1 heure avec 4% de BSA avant l'immunomarquage. Les MPCs sont ensuite incubés avec l'anticorps anti-Ki67 (1:100, #15580, Abcam)) et visualisés en utilisant un anticorps secondaire conjugué à la cyanine 3 (#712-165-

153, cy3 - Jackson Immunoresearch). Pour les expériences de myogenèse, les MPC ont été ensemencés à 30000 cellules/cm² sur du Matrigel (1:10) pendant 3 jours avec le milieu conditionné des macrophages contenant 2% de sérum de cheval (HS). Les cellules ont été marquées avec un anticorps anti-desmin à 1:200 (#32362, Abcam) et visualisées grâce à un anticorps secondaire conjugué à la cyanine 3 (Jackson immunoresearch).

REACTION EN CHAÎNE QUANTITATIVE PAR POLYMERASE (RT-QPCR)

Pour les expériences de RT-qPCR, les macrophages ont été ensemencés à 200 000 cellules/puits dans des plaques de 12 puits (3,5cm²) avec du DMEM contenant 10% de SVF. Ils ont été traités pendant 3 jours avec de l'IFN γ à 1 μ g/mL (#485-MI-100, RD systems), de l'IL4 à 2 μ g/mL (RD systems #404-ML-010) ou de l'IL10 à 2 μ g/m (#417-ML-005, RD systems). Ensuite, les ARN totaux ont été extraits à l'aide du kit RNeasy Plus Micro (#74034, QIAGEN). Les ADN complémentaires (cDNA) ont été synthétisés en utilisant la transcriptase inverse Superscript II RT et la qPCR a été réalisée en triplicata sur un système de détection PCR en temps réel CFX Connect™ (Bio-Rad). Les mélanges réactionnels avaient un volume final de 10 μ l, composé de 2 μ l de H₂O, 2 μ l de cDNA, 1 μ l d'amorces (10 μ M) et de 5 μ l de réactif LightCycler® 480 SYBR Green I Master. Le programme est constitué d'une dénaturation initiale de l'ADN réalisée à 95°C, suivi de 45 cycles composés d'une autre dénaturation (10 s), de l'hybridation à 60°C (5 s) et de l'élongation à 70°C (10 s). Le calcul de l'expression relative a été déterminé par le logiciel Bio-Rad CFX Manager™ et le niveau d'expression a été déterminé par la méthode $\Delta\Delta$ Ct, qui décrit l'amplification exponentielle de la PCR. La normalisation a été effectuée avec le gène de ménage Cyclophilin A. Ensuite, ces valeurs ont été utilisées pour effectuer des analyses statistiques. Les amorces utilisées sont décrites dans le Tableau 2.

WESTERN BLOT

Les macrophages ont été ensemencés à 2 millions de cellules/puits dans des plaques 8 puits pour des expériences de Western Blot. Les cellules ont été traitées avec de l'IFN γ à 1 μ g/mL (#485-MI-100, RD systems), de l'IL4 à 2 μ g/mL (#404-ML-010, RD systems) ou de l'IL10 à 2 μ g/m (#417-ML-005, RD systems) pendant 3 jours dans du DMEM contenant 10% de SVF et 1% de PS. Ensuite, ces cellules ont été lavées 1 fois avec du PBS et un milieu DMEM contenant 10% de SVF charcoal (constitué de faibles concentrations de facteurs de croissance) (#12676029, Gibco Thermofisher scientific) et 1% de PS a été ajouté pendant 1 heure, suivi des activateurs de l'AMPK: 0,1 mM d'AICAR (#2627-69-2, Tocris), 1 μ g/ml d'alarmines (ou

signaux de danger (DAMPs) extrait des muscles endommagés) ou 1 mM de 991 (#129739-36-2, Spirochem). Le traitement a été réalisé pendant 1 heure. L'extrait protéique total de deux millions de macrophages a été obtenu ensuite dans un tampon de lyse cellulaire contenant du Tris-HCl 50 mM (pH 7,5), de l'EDTA 1 mM, de l'EGTA 1 mM, du saccharose 0,27 M, du triton 20%, du glycérol-2-phosphate disodique, du NaF 50 mM, du PMSF 0,5 mM, de la benzamidine 1 mM, du Na₃VO₄ 1 mM et 1% d'un cocktail inhibiteur de phosphatase 3 (SIGMA, #P0044). Le dosage colorimétrique de protéines a été réalisé avec la méthode de l'acide Bicinchoninique (BCA) (#23225, Kit BCA ThermoFischer). Puis, les protéines ont migré dans un gel de bis acrylamide à 10% pendant 1 heure et 30 minutes à 120V. Les protéines ont été transférées sur une membrane de nitrocellulose dans un tampon Tris-glycine-SDS (TGS) contenant du Tris (25mM), de la glycine (192mM) et 10% d'éthanol pendant une nuit à 4°C, 30V. La membrane a été ensuite incubée avec du rouge ponceau jusqu'à l'apparition des bandes afin de contrôler l'efficacité du transfert, puis rincées avec du tampon TBS-T 0,1% contenant du Tris (10mM), du NaCl (0,15M) et du détergent Tween à 0,1%. Ensuite, la membrane a été incubée dans une solution de saturation TBS1X-Tween 0.1% + 5% BSA pendant 1 heure à température ambiante puis incubée pendant une nuit à 4°C avec les anticorps dirigés contre la forme phosphorylée de l'AMPK à 1:1000 (#2535, Cell Signalling), AMPK α à 1:1000 (#2532, Cell Signalling), le récepteur aux glucocorticoïdes à 1:1000 (#3660, Cell Signalling) ou la β -actine à 1:2000 pour le contrôle du dépôt (#A5316, SIGMA). La membrane a été rincée avec le tampon TBS-T 0,1% et incubée avec l'anticorps secondaire couplé à une peroxidase (#G-21234, ThermoFisher Scientific) dilué au 1:10000 puis révélée au Chemidoc (Biorad MP Image Systems) grâce à un produit chimiluminescent ultra-sensible (ECL) (#32209, ECL Western blot substrat Thermo) pour les protéines de détection simple comme l'actine, l'AMPK α et le récepteur aux glucocorticoïdes. Pour la détection de la p-AMPK, un révélateur plus puissant a été utilisé (#34095, ECL Super Signal West Femto, Thermo).

QUANTIFICATION DE LA SUPPRESSION DE SEPP1 DANS LES MACROPHAGES *IN VIVO*

La quantification de la délétion de Sepp1 dans les macrophages a été réalisée par analyse de la réaction en chaîne par polymérase (PCR) après l'isolation des cellules myéloïdes. La moelle osseuse a été extraite des souris puis les érythrocytes ont été lysés avec le tampon de lyse Ammonium-Chloride-Potassium (ACK) (#10-548E, Lonza). Ensuite, pour obtenir le phénotype cellulaire des macrophages, les récepteurs Fc ont été bloqués avec le réactif de

blochage (FcR Blocking Reagent) (#130-059-901, Miltenyi Biotec) pour éviter la fixation du fragment Fc des immunoglobulines aux récepteurs, puis les cellules ont été incubées avec un anticorps CD11b couplé à la biotine à 4°C pendant 20 minutes. La population de cellules CD11b positive a été purifiée en utilisant des billes magnétiques anti-biotine (#130-110-951, Miltenyi Biotec). L'ADN génomique de cellules CD11b⁺ a été extrait en utilisant un tampon de lyse cellulaire contenant du Tris-HCl 100 mM (pH 8), de l'EDTA 5 mM, du NaCl 200 mM, du SDS à 0,2% et de 0,1 mg/ml de protéinase K (#EO0491, Roche) pendant 2 h à 55°C. L'ADN extrait a été précipité avec de l'isopropanol et du glycogène. L'ADN a été lavé avec éthanol 70%, séché et enfin solubilisé dans de l'eau. La PCR a été réalisée en utilisant l'ADN polymérase Phire Hot Start II (#F122S, Thermofisher Scientific) comme décrit précédemment (Mounier et al., 2013). Les amorces utilisées sont décrites dans le Tableau 3.

ANALYSES STATISTIQUES

Toutes les expériences ont été réalisées et analysées à partir d'un minimum de trois expériences indépendantes pour chaque groupe. Les tests statistiques ont été réalisés avec le logiciel GraphPad Prism. La normalité a été testée avec le test Shapiro-Wilk. En fonction de l'expérience et de la normalité, des tests paramétriques (test de Student ou ANOVA) ou non paramétriques (Mann-Whitney, Kruskal-Wallis) ont été utilisés. P < 0,05 était considéré comme significatif.

LISTE DES ANTICORPS ET DES AMORCES

Anticorps Secondaires	Références
Cy3-conjugated Anti-Rat IgG	712-165-1153
Cy5-conjugated Anti-Rabbit IgG	711-175-152
FITC-conjugated Anti-Rabbit IgG	711-095-152
Cy3-conjugated Anti-Goat IgG	705-165-147

Tableau 1: Liste des anticorps secondaires utilisés pour vérifier l'expression protéique par Immunofluorescence

Gène	Séquences d'amorces
PGC1 β	Sens: TGACGTGGACGAGCTTTCAC Anti-Sens: GGGTCTTCTTATCCTGGGTGC
TNF α	Sens: AATGGCCTCCCTCTCATCAGTT

	Anti-Sens: CGAATTTTGAGAAGATGATCTGAGTGT
COX2	Sens: CAGCCAGGCAGCAAATCC Anti-Sens: ACATTCCCCACGGTTTTGAC
Cyclophiline	Sens: GTGACTTTACACGCCATAATG Anti-Sens: ACAAGATGCCAGGACCTGTAT
GPX3	Sens: AGCCAGCTACTGAGGTCTGA Anti-Sens: GGGAAGCCCAGAATGACCAA
Sepp1	Sens: TGGCCGTCTTGTGTATCACCT Anti-Sens: GATTGCAGTTTCCGCACCTCT

Tableau 2: Liste des amorces utilisées pour vérifier l'expression de gènes par q-PCR

Gène	Séquences d'amorces
Sepp1	Sens: TCCTAGATTGGCAGAGGATAGAATGAA Anti-Sens: CGGGGAAATGCTTGTTGCTT

Tableau 3: Liste des amorces utilisées pour vérifier la délétion de Sepp1 *in vivo* par PCR

Résultats

Les sélénoprotéines régulent l'acquisition du phénotype fonctionnel des macrophages

Le statut inflammatoire des macrophages a des fonctions spécifiques au cours de la myogenèse, contribuant à la régénération musculaire (Arnold et al., 2007 ; Saclier et al., 2013 ; Mounier et al., 2013; Varga and Mounier et al., 2016). Les macrophages pro-inflammatoires favorisent la prolifération des précurseurs myogéniques (*i.e.* myoblastes), alors que les macrophages anti-inflammatoires soutiennent la myogenèse en stimulant la différenciation des myoblastes et leur fusion en myotubes. Comme il a été démontré que les molécules sécrétées par les macrophages peuvent contribuer à leurs fonctions myogéniques (Arnold et al., 2007 ; Saclier et al., 2013 ; Mounier et al., 2013 ; Varga and Mounier et al., 2016 ; Tonkin et al., 2015), nous avons réalisé des expériences de co-culture de cellules musculaires et de milieu conditionné des macrophages, afin d'identifier les propriétés fonctionnelles des macrophages pro et anti-inflammatoires provenant des modèles WT, GPX3^{-/-} (GPX3 KO), Sepp1^{-/-} (SEPP KO), Sepp1^{U40S/U40S} (SER MUT) et Sepp1^{Δ240-361} (SEPP TRC) (Figure 1A) sur les étapes initiales et finales de la myogenèse (Figure 1B).

La prolifération des précurseurs myogéniques a été mesurée par immunomarquage Ki67 après la co-culture entre ces précurseurs et un milieu conditionné des macrophages précédemment traités par IFN γ ou IL-10 (Figure 2A). Comme attendu, les résultats démontrent que le milieu conditionné des macrophages pro-inflammatoires WT sont capables d'induire la prolifération des précurseurs myogéniques (Figure 2B). En outre, les macrophages anti-inflammatoires (Figures 2B et 2C) présentent une perte (+/- 20%) de cet effet par rapport à la population pro-inflammatoire (Figures 2B et 2C). Cependant, cette différence liée au phénotype entre la population pro et anti-inflammatoire (Figures 2B et 2C) n'est pas observée avec le milieu conditionné de macrophages SEPP KO et GPX3 KO (Figures 2B et 2C), suggérant que ces deux sélénoprotéines sont nécessaires pour que les macrophages puissent exercer leurs fonctions sur la prolifération des précurseurs myogéniques.

De plus, afin d'identifier si l'activité antioxydante (modèle SER MUT) et le transport du sélénium (modèle SEPP TRC) de Sepp1 sont impliqués dans ce phénotype, nous avons réalisé la même expérience de co-culture. Les résultats montrent un phénotype similaire au groupe WT. Le milieu conditionné de macrophages pro-inflammatoires SER MUT stimule la prolifération des myoblastes (Figures 2D et 2E), différemment du milieu conditionné de macrophages anti-inflammatoires qui présentent une réduction de cette capacité (Figures 2D et 2E), ce qui suggère que l'activité antioxydante de cette protéine n'est pas impliquée dans cette

étape de la myogenèse. En outre, de façon intéressante, le milieu conditionné de macrophages SEPP TRC induit un phénotype inverse par rapport au milieu conditionné de macrophages WT (Figures 2D et 2E). Effectivement, le milieu conditionné provenant des macrophages pro-inflammatoires SEPP TRC engendre une réduction de 25% de la prolifération des myoblastes par rapport au milieu conditionné de macrophages WT (Figures 2D et 2E). De plus, le milieu conditionné de macrophages anti-inflammatoires SEPP TRC augmente en 15% sa capacité en stimuler la prolifération des cellules musculaires par rapport au milieu conditionné provenant des macrophages anti-inflammatoires WT (Figures 2D et 2E), suggérant que la fonction de la *Sepp1* sur le transport du sélénium est importante pour que les macrophages puissent agir sur la prolifération des précurseurs myogéniques.

Les étapes finales de la myogenèse (*i.e.* différenciation et fusion des précurseurs myogéniques) *in vitro* ont été évaluées en utilisant des expériences de co-culture similaires et un immunomarquage de la desmine (une protéine constituante des filaments intermédiaires du muscle strié) afin d'identifier les myotubes formés (Figure 3A). Comme prévu, les expériences démontrent que le milieu conditionné des macrophages anti-inflammatoires WT favorisent la différenciation et la fusion des myoblastes (+ 22%, Figures 3B et 3C), alors que le milieu conditionné des macrophages anti-inflammatoires issus des modèles murins SEPP KO et GPX3 KO n'induit pas cette stimulation de la formation de myotubes (Figures 3B et 3C). De plus, le milieu conditionné des macrophages pro-inflammatoires issus des modèles murins SER MUT augmentent de 15% sa capacité en stimuler la fusion des myoblastes, par rapport au milieu conditionné des macrophages pro-inflammatoires WT. Le milieu conditionné des macrophages issus des modèles murins SEPP TRC démontre également un défaut de fonction. Cette fois-ci, sont les macrophages anti-inflammatoires qui présentent une capacité réduite de stimuler la fusion par rapport aux macrophages anti-inflammatoires WT. Ces résultats montrent une altération du phénotype des macrophages en absence de l'activité antioxydante (modèle SER MUT) et du transport du sélénium (modèle SEPP TRC) qui engendre la dérégulation du phénotype myogénique (Figures 3D et 3E).

L'ensemble de ces expériences montre que l'absence des sélénoprotéines SEPP1 et GPX3 dans les macrophages anti-inflammatoires peuvent induire la prolifération des précurseurs myogéniques de la même façon que les macrophages pro-inflammatoires WT, suggérant une dérégulation de l'acquisition du phénotype anti-inflammatoire des macrophages médiés par SEPP1 et GPX3. Ces résultats soulignent l'importance de la fonction du transport du sélénium de SEPP1 dans l'étape de prolifération cellulaire. De plus, en absence de SEPP1 ou de GPX3 dans les macrophages, une dérégulation de l'acquisition du phénotype anti-inflammatoire est

encore une fois montrée *via* l'effet de la l'invalidation de SEPP1 ou de GPX3 dans les macrophages sur formation des nouveaux myotubes. Dans ce contexte, les deux fonctions de la Sepp1 sont impliquées dans le défaut du phénotype présenté.

A

Animal Models	Redox Activity	Selenium Transport
WILD TYPE	yes	yes
SEPP KO	no	no
GPX3 KO	no	----
SER MUT	no	yes
SEPP TRC	yes	no

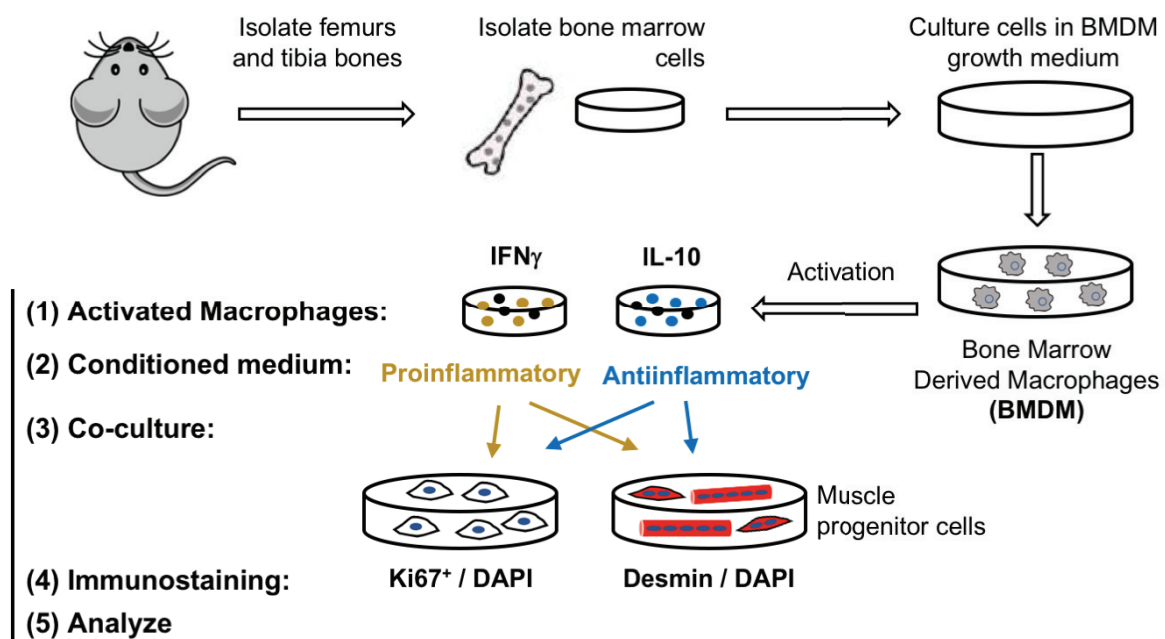
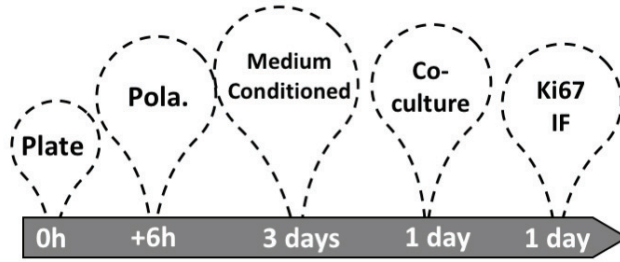
B Experimental protocol : Myogenesis *In vitro*

Figure 1 : Les modèles *in vitro* et *in vivo*. (A) Les expériences de cette étude ont été réalisées avec les modèles de souris WT, SEPP KO (absentes pour l'activité antioxydante et pour le transport du sélénium), SEPP SER MUT (absentes pour l'activité antioxydante), SEPP TRUNCATED (absentes pour le transport du sélénium) et GPX3 KO (absentes pour l'activité antioxydante) (B) Le protocole utilisé pour analyser les effets du milieu conditionné des macrophages (traités pendant 3 jours avec de l'IFN γ ou de l'IL-10) sur la prolifération des myoblastes (immunomarquage anti-Ki67) ou sur la myogenèse (immunomarquage anti-desmine).

A Experimental protocol : *In vitro* myoblast Proliferation

BMDM

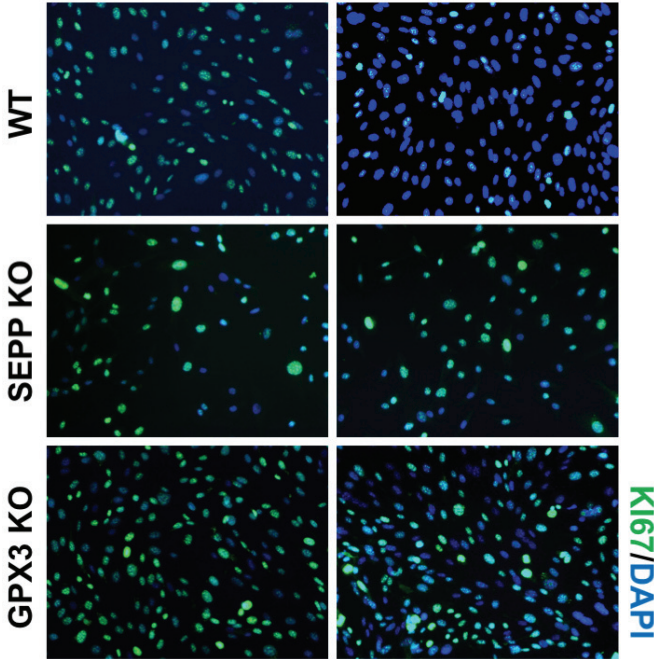
WILD TYPE
SEPP KO
GPX3 KO
SEPP TRC
SER MUT



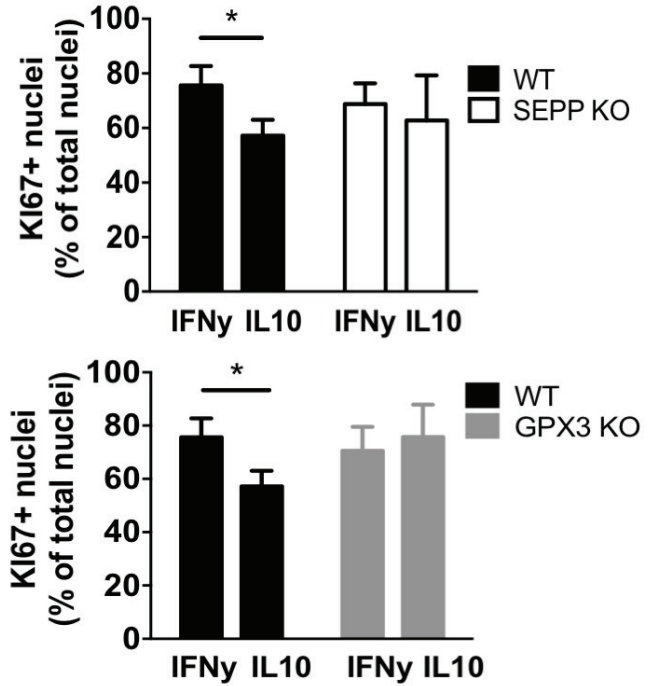
B

MP – conditioned medium

IFN- γ IL-10



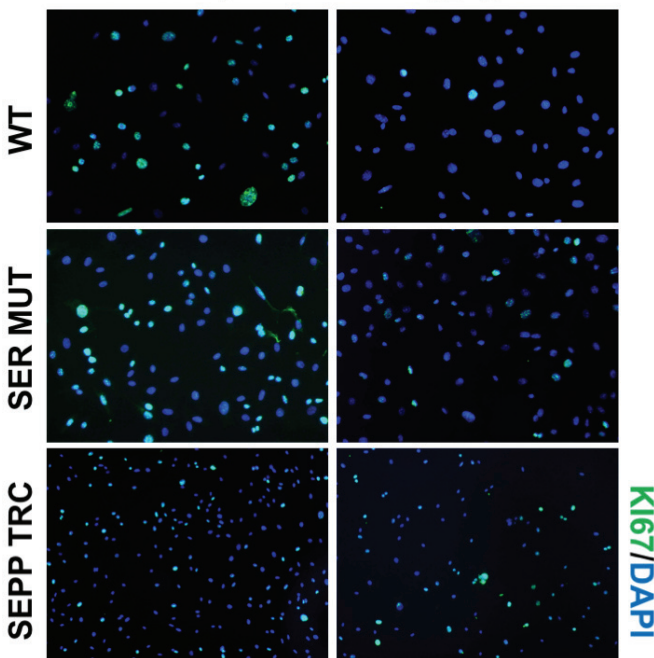
C



D

MP – conditioned medium

IFN- γ IL-10



E

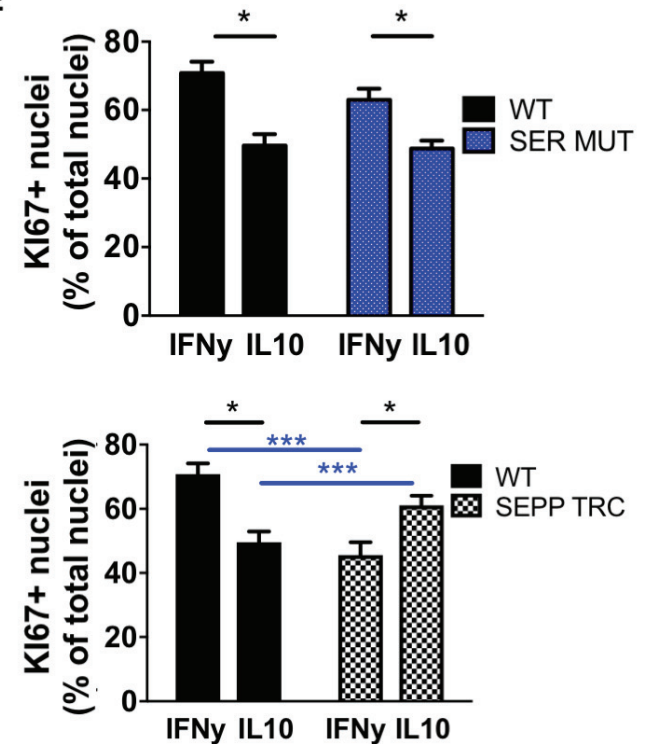
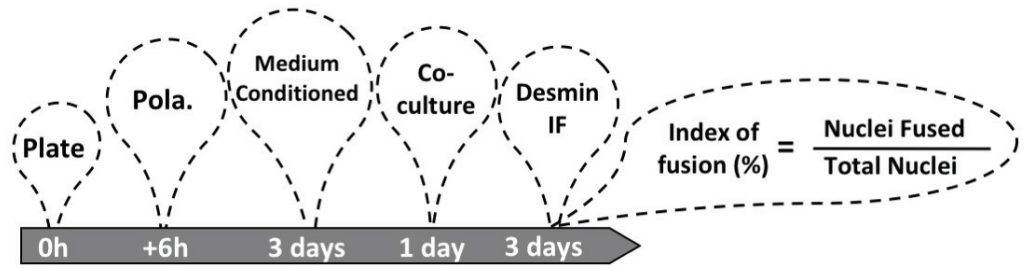


Figure 2 : Les effets des macrophages sur la prolifération des précurseurs myogéniques sont modifiés en absence de sélénoprotéines. Des expériences de co-culture ont été effectuées pour analyser la fonction des macrophages (provenant de la moelle osseuse de souris WT ou génétiquement modifiées traitées par les cytokines IFN γ ou IL-10) sur les myoblastes. **(A)** Pour les expériences de co-culture les macrophages ont étéensemencés et polarisés avec les cytokines pendant 6h après ensemencement. Puis, après 3 jours de polarisation, le milieu conditionné des macrophages a été préparé pendant 1 jour d'incubation des macrophages avec du milieu dépourvu de sérum et de cytokines. Ensuite, la co-culture entre le milieu conditionné des macrophages et les myoblastes (1 jour) a été réalisée avant que l'immunofluorescence ne soit effectuée. **(B)** Quantification des myoblastes en prolifération (cellules positives pour Ki67) en co-culture avec le milieu conditionné de macrophages WT, SEPP KO ou GPX3 KO traités avec l'IFN γ ou l'IL10. **(C)** Le graphique représente le pourcentage de myoblastes Ki67 positifs. **(D)** Quantification des myoblastes en prolifération (cellules positives pour Ki67) en co-culture avec le milieu conditionné de macrophages WT, SER MUT ou SEPP TRC traités avec IFN γ ou IL10. **(E)** Le graphique représente le pourcentage de myoblastes Ki67 positives. * p <0,05 par rapport à la condition IL-10 entre les groupes. (n=6) Statistique : Test 2way ANOVA

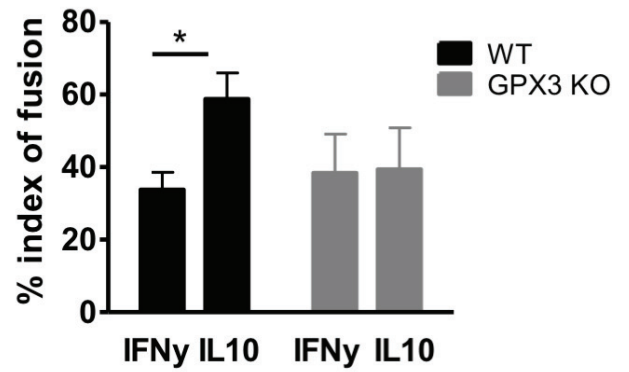
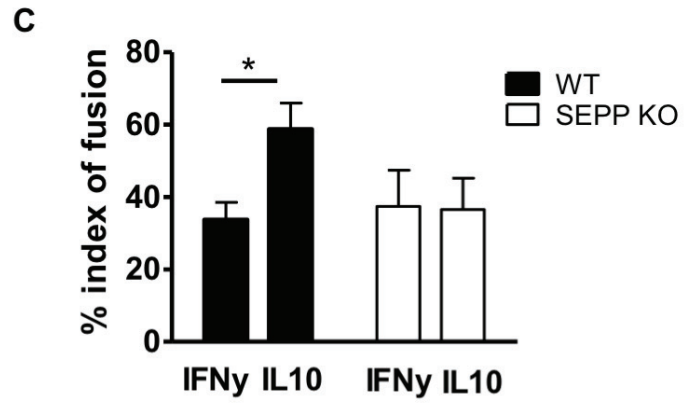
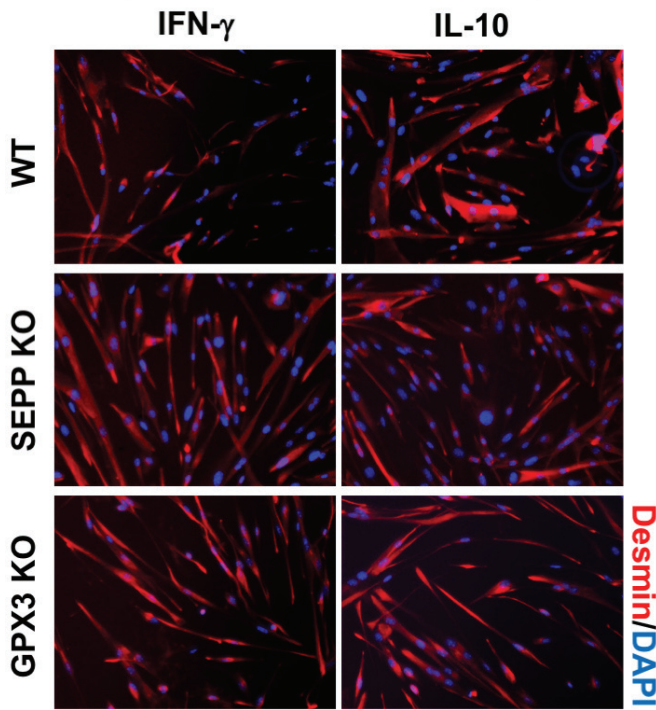
A Experimental protocol : *In vitro* Myogenesis

BMDM

WILD TYPE
SEPP KO
GPX3 KO
SEPP TRC
SER MUT



B MP – conditioned medium



D MP – conditioned medium

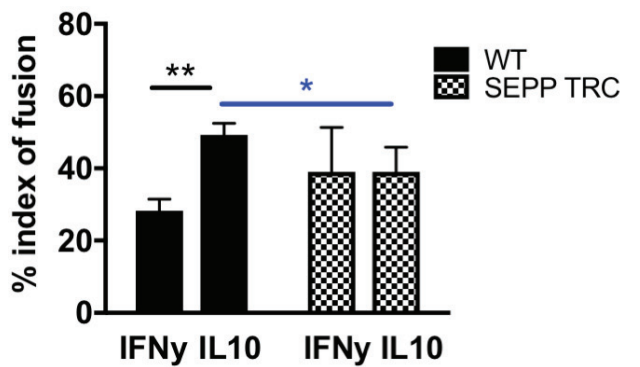
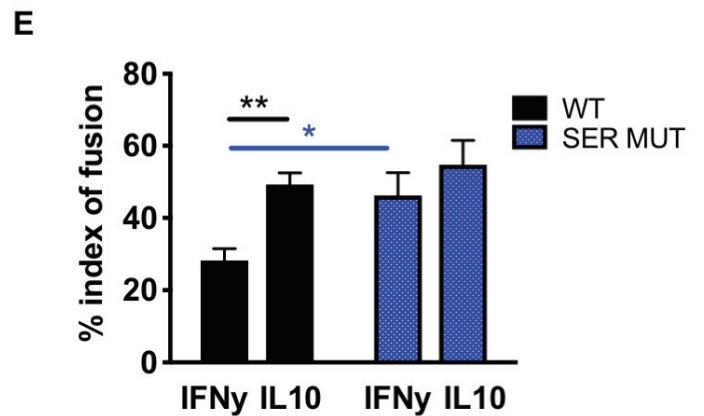
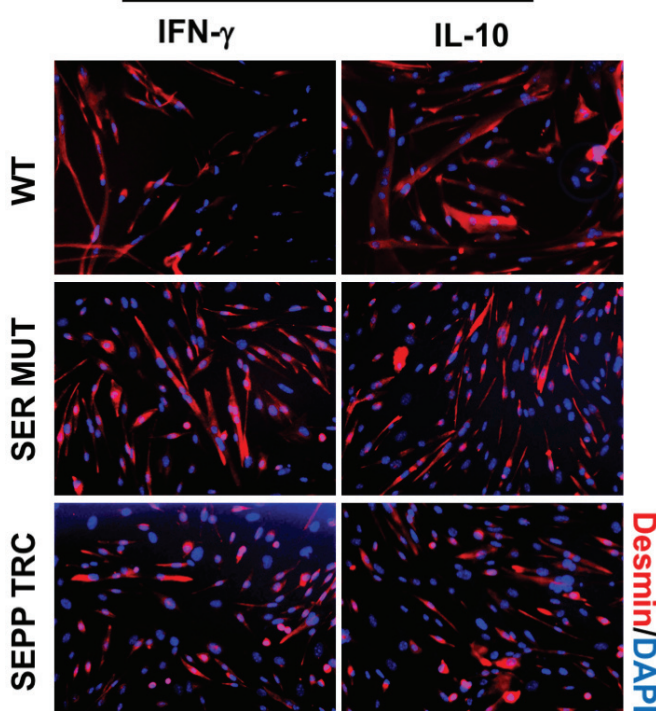


Figure 3 : L'acquisition fonctionnelle du statut anti-inflammatoire des macrophages induits par IL-10 sur la myogenèse requiert les sélénoprotéines Sepp1 et GPX3. Des expériences de co-culture ont été effectuées pour analyser la fonction des macrophages (provenant de la moelle osseuse de souris WT ou génétiquement modifiées traitées par les cytokines IFN γ ou IL-10) sur les myoblastes. (A) Pour les expériences de co-culture les macrophages ont étéensemencés et polarisés avec les cytokines pendant 6h après ensemencement. Puis, après 3 jours de polarisation, le milieu conditionné des macrophages a été préparé pendant 1 jour d'incubation des macrophages avec du milieu dépourvu de sérum et de cytokines. Ensuite, la co-culture entre le milieu conditionné des macrophages et les myoblastes (1 jour) a été réalisée avant que l'immunofluorescence ne soit effectuée. (B) Quantification de myotubes (cellules positives pour la desmine) en co-culture avec le milieu conditionné de macrophages WT, SEPP KO ou GPX3 KO traités avec de l'IFN γ ou de l'IL10. (C) Le graphique représente le pourcentage de myotubes (cellules positives pour la desmine). (D) Quantification des myotubes (cellules positives pour la desmine) en co-culture avec le milieu conditionné de macrophages WT, SER MUT ou SEPP TRC traités avec de l'IFN γ ou de l'IL10. (E) Le graphique représente le pourcentage de myotubes (cellules positives pour la desmine). * p <0,05 et ** p <0,01 par rapport à la condition IFN γ . (n=6) Statistique : Test 2way ANOVA

Les sélénoprotéines régulent l'acquisition du statut inflammatoire des macrophages

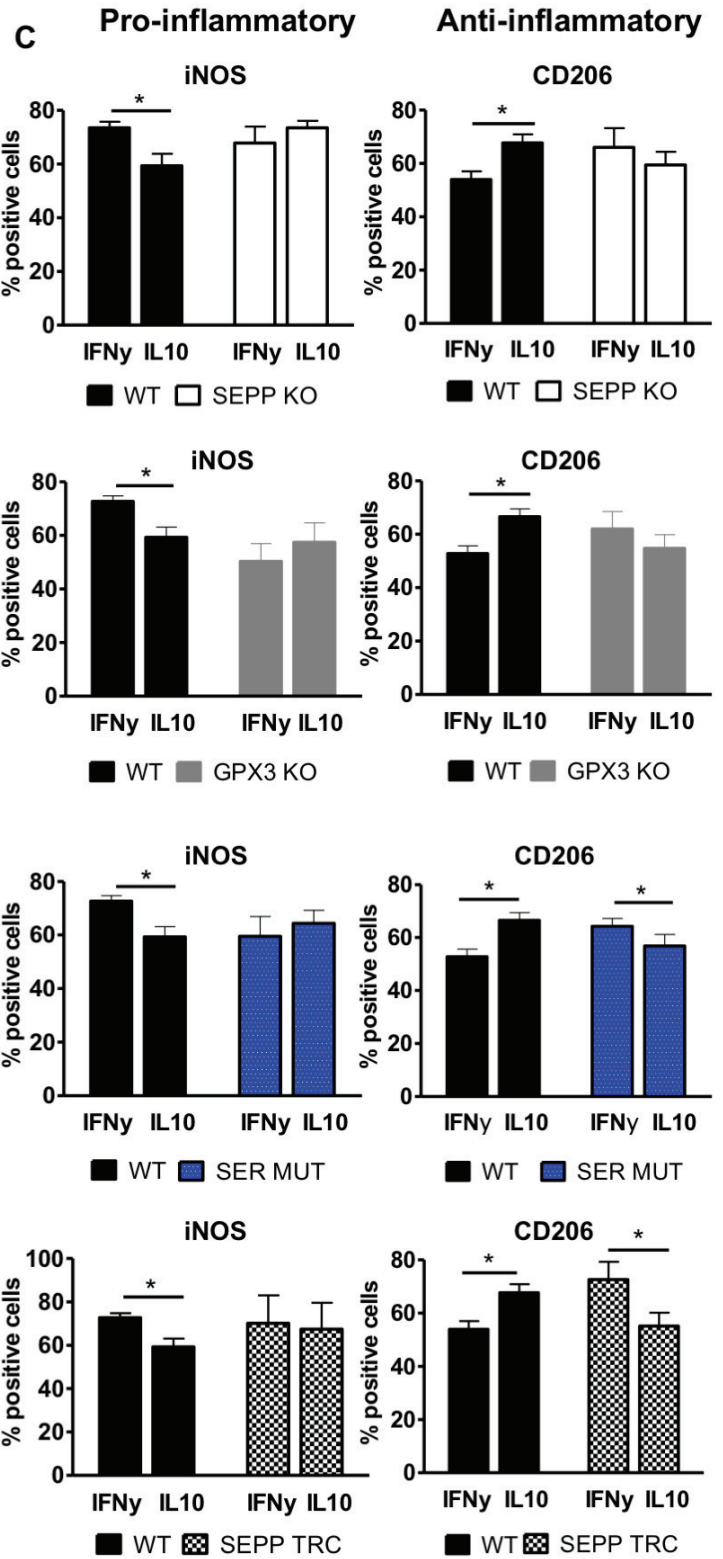
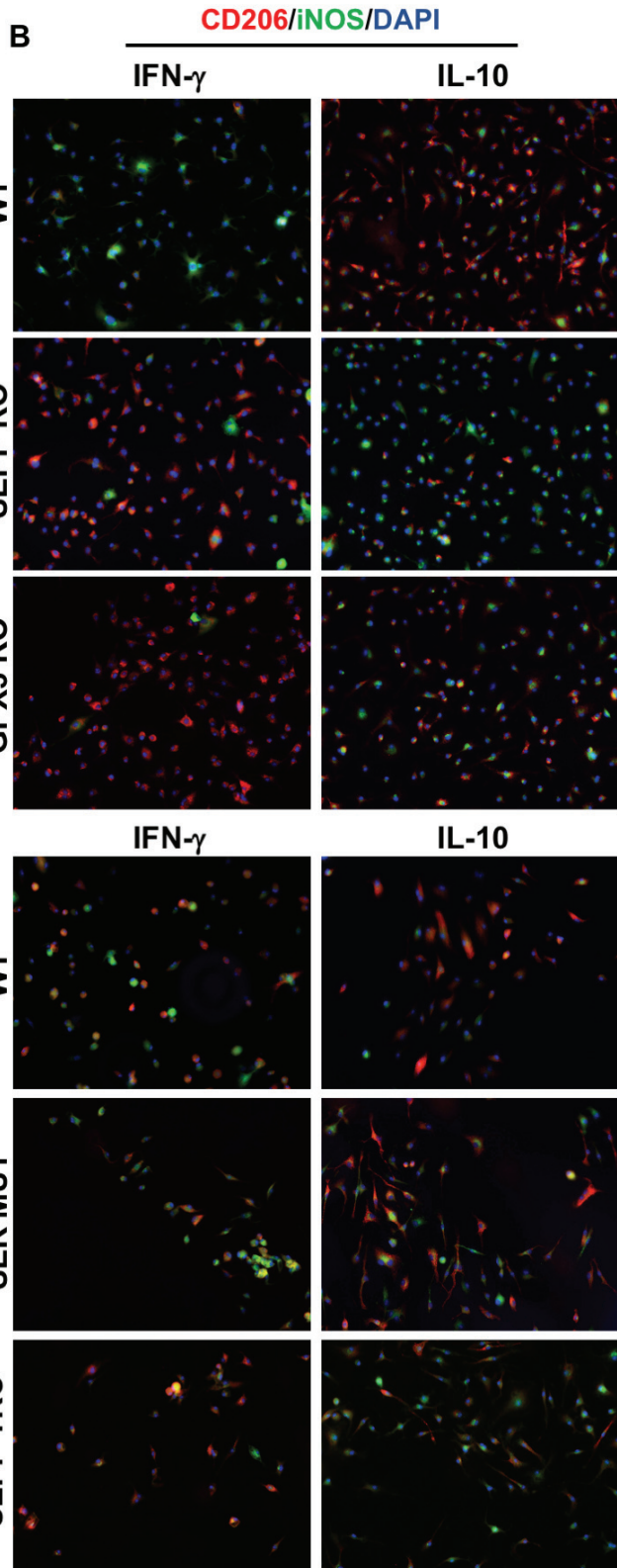
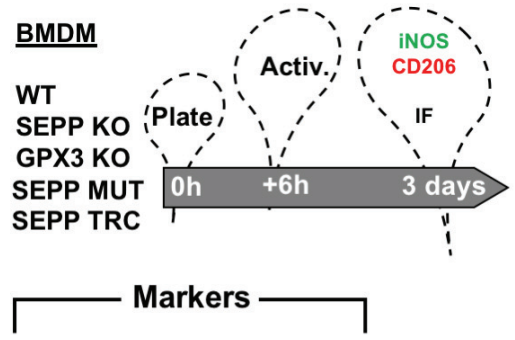
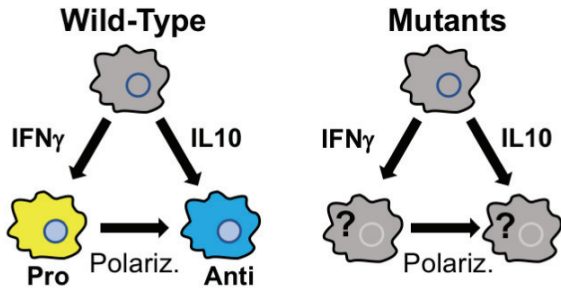
Nous avons démontré *in vitro* que l'absence de Sepp1 et GPX3 dans les macrophages conduisait à un défaut de la myogenèse. Comme les profils pro et anti-inflammatoires des macrophages sont nécessaires pour soutenir la myogenèse, nous avons analysé si les sélénoprotéines étaient nécessaires pour l'acquisition de ces phénotypes induits par les cytokines IFN γ ou IL10. Les macrophages dérivés de la moelle osseuse isolées de souris WT, GPX3 KO, Sepp1 KO, SER MUT ou SEPP TRC ont été traités pendant 3 jours avec IFN γ ou IL10. Étant donné que la régulation des effecteurs inflammatoires est modifiée au niveau post-transcriptionnel (Lawrence and Natoli, 2011), l'expression de quatre marqueurs de polarisation des macrophages a été analysée par immunofluorescence afin d'élucider le profil inflammatoire des macrophages en absence de SEPP ou GPX3 (Figure 4A et 4B). L'oxyde nitrique synthase (iNOS) montre une augmentation de 18% d'expression dans les macrophages WT pro-inflammatoires par rapport aux macrophages anti-inflammatoires (Figures 4B et 4C). Cependant, en absence de Sepp1 (SEPP KO), de GPX3 (GPX3 KO) ainsi qu'en absence de l'activité antioxydante (SER MUT) ou du transport du sélénium (SEP TRC) de Sepp1, cette différence entre les macrophages pro et anti-inflammatoires n'est pas observée, suggérant que ces molécules sont nécessaires pour l'acquisition du phénotype anti-inflammatoire M2 des macrophages (Figures 4B et 4C). De plus, dans la population de macrophages WT, le traitement

avec la cytokine anti-inflammatoire IL10 a augmenté le nombre de cellules exprimant le marqueur anti-inflammatoire CD206 (récepteur au mannose) par rapport à la condition traitée avec la cytokine pro-inflammatoire IFN γ (+12%, [Figures 4B et 4C](#)). Par contre, cette différence n'est pas retrouvée dans les populations de macrophages SEPP KO et GPX3 KO. De plus, ce phénotype est inversé en absence de l'activité antioxydante (SER MUT) et du transport de sélénium (SEPP TRC) ([Figures 4B et 4C](#)). En effet, l'expression du récepteur CD206 est augmentée dans les macrophages pro-inflammatoires par rapport aux macrophages anti-inflammatoires dans ces deux modèles ([Figures 4B et 4C](#)).

Enfin, les macrophages WT pro-inflammatoires présentent une augmentation de l'expression d'un autre marqueur pro-inflammatoire (CCL3, le ligand de la chimiokine 3) ([Figures 4D](#)) par rapport aux macrophages anti-inflammatoires (+25%, [Figures 4E et 4F](#)), tandis qu'aucune différence n'a été observée dans les modèles invalidés pour les sélénoprotéines Sepp 1 et GPX3 KO ([Figures 4E et 4F](#)). Dans nos conditions expérimentales *in vitro*, une augmentation de l'expression du marqueur anti-inflammatoire CD163 (Cluster Differentiation 163) par les macrophages anti-inflammatoires WT a été observée ([Figure 4E, 4F](#)) alors qu'aucune différence n'a été trouvée dans les modèles Sepp1 KO et GPX3 KO.

L'ensemble de ces résultats indique que les sélénoprotéines GPX3 et Sepp1 sont nécessaires à l'acquisition *in vitro* du profil anti-inflammatoire.

A Indirect role of Selenoproteins on Myogenesis



D

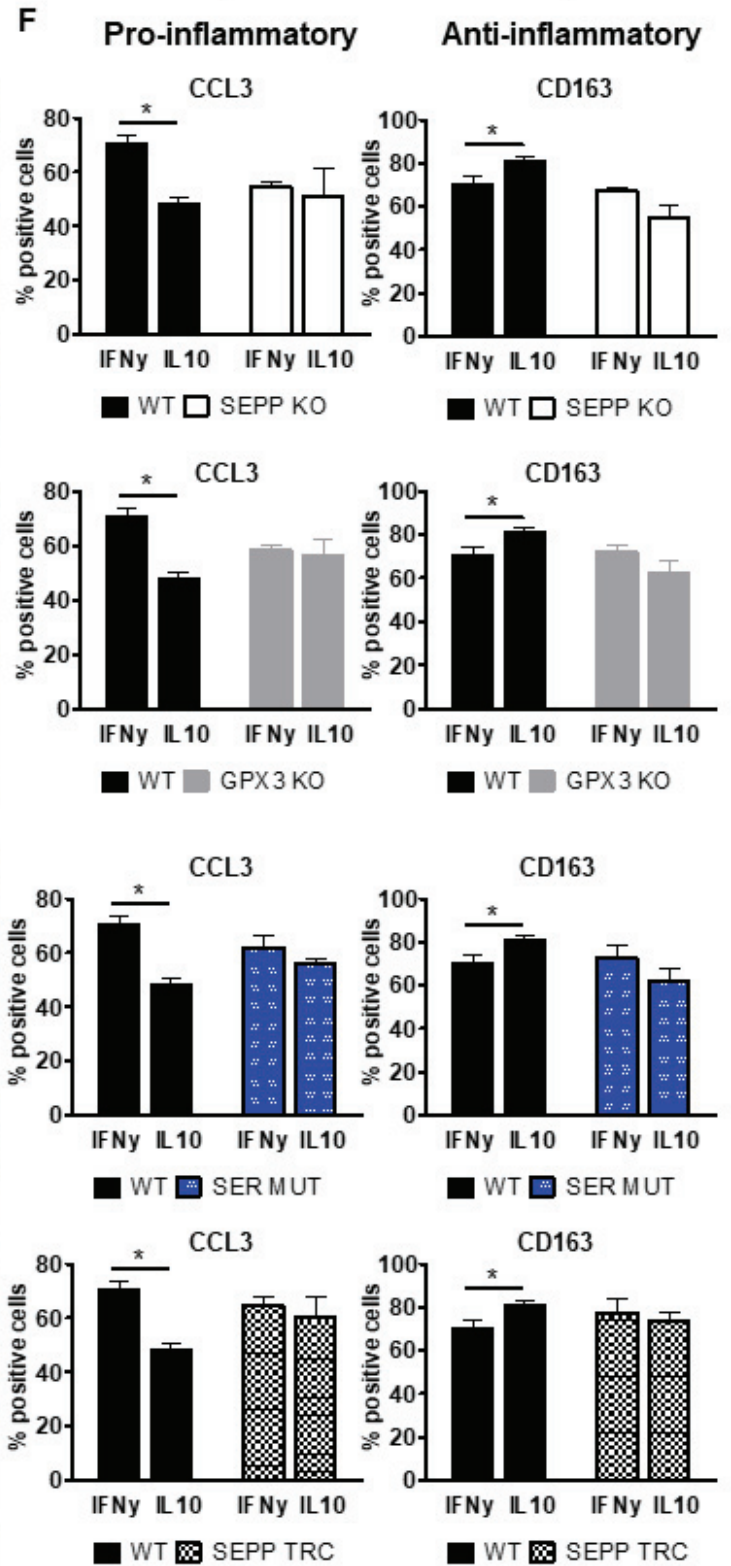
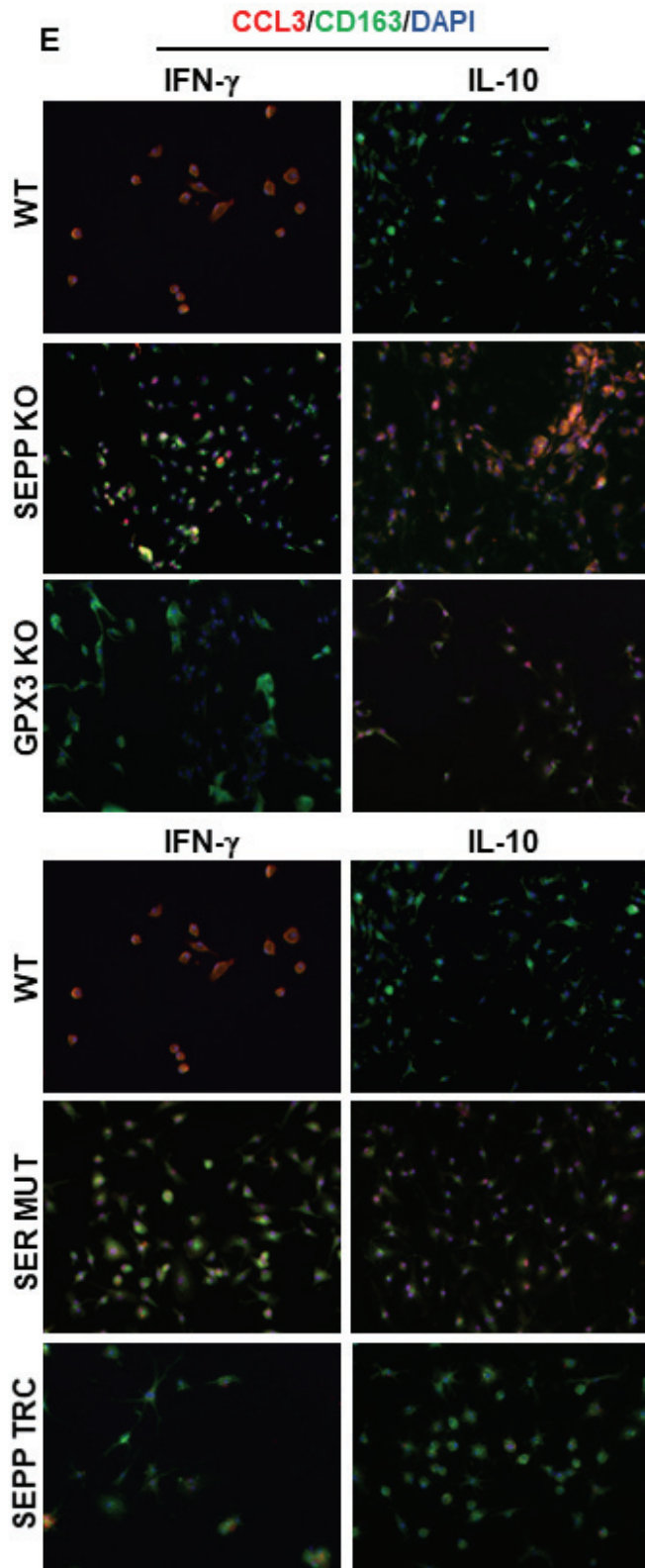
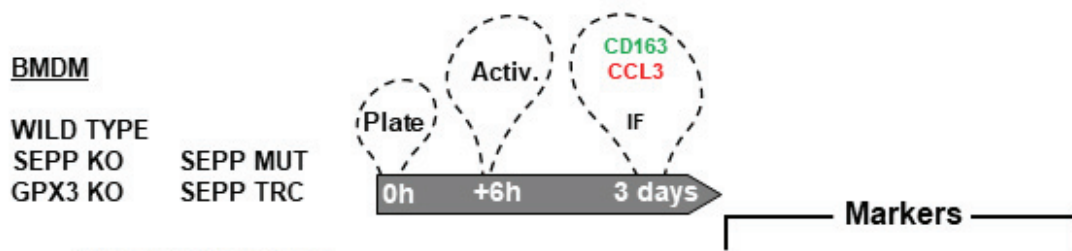


Figure 4 : Les sélénoprotéines sont requises pour induire le profil pro et anti-inflammatoire des macrophages. (A) Afin d'évaluer l'importance des sélénoprotéines sur le changement de phénotype des macrophages les cellules ont été activés avec IFN γ ou IL-10 pour obtenir un phénotype pro-inflammatoire M1 ou anti-inflammatoire M2, respectivement. L'expression des marqueurs iNOS et CD206 a été quantifiée 3 jours après cette activation. (B) Le nombre de cellules exprimant le marqueur pro-inflammatoire iNOS et le marqueur anti-inflammatoire CD206 étaient quantifiés manuellement grâce à des expériences d'immunofluorescence. (C) La quantification des marqueurs a été réalisée manuellement par le comptage des cellules positives pour chaque protéine analysée. * p <0,05 iNOS : par rapport à la condition IFN γ ; CD206 : par rapport à la condition IL10. (D) Afin d'évaluer l'importance des sélénoprotéines sur le changement de phénotype des macrophages les cellules ont été activés avec IFN γ ou IL-10 pour obtenir un phénotype pro-inflammatoire M1 ou anti-inflammatoire M2, respectivement. L'expression des marqueurs CCL3 et CD161 a été quantifiée 3 jours après cette activation. (E) Le nombre de cellules exprimant le marqueur pro-inflammatoire CCL3 et le marqueur anti-inflammatoire CD163 étaient quantifiés manuellement grâce à des expériences d'immunofluorescence. (F) La quantification des marqueurs a été réalisée manuellement par le comptage des cellules positives pour chaque protéine analysée. * p <0,05 CCL3 : par rapport à la condition IFN γ ; * p <0,05 CD163 : par rapport à la condition IL10. (n=6) Statistique : Test 2way ANOVA

L'inflammation est perturbée en absence des sélénoprotéines ce qui compromet la régénération musculaire

Au décours des analyses qui démontrent que les sélénoprotéines soutiennent l'acquisition d'un phénotype pro et anti-inflammatoire des macrophages *in vitro*, nous avons émis l'hypothèse que ces molécules sont également nécessaires au changement de phénotype des macrophages au cours de la régénération musculaire. Pour cela, nous avons analysé les muscles *Tibialis Anterior* (TA) pendant plusieurs jours après une lésion induite par la cardiotoxine, un venin de serpent qui provoque la nécrose de la myofibre (Hardy et al., 2016) (Figure 5A). Notre équipe a déjà démontré que les macrophages sont requis après une lésion musculaire. Les macrophages acquièrent dans un premier temps un phénotype pro-inflammatoire puis changent pour un phénotype anti-inflammatoire dans un second temps (*i.e.* à partir du 2^{ème} jour). Ce phénotype anti-inflammatoire est maintenu jusqu'à la fin de la résolution de l'inflammation (*i.e.* 7^{ème}/8^{ème} jour) (Arnauld et al., 2007 ; Saclier et al., 2003 ; Mounier et al., 2013). Nos résultats montrent qu'un jour après la lésion la population de macrophages pro-inflammatoire est présente à plus de 80% (Figure 5B), et qu'à partir du 2^{ème} jour cette population se réduit en laissant la place aux macrophages anti-inflammatoires qui augmentent de façon très importante (6 fois) (Figure 5B), confirmant nos travaux précédents. Aucune différence significative n'a été observée entre les modèles murins invalidés pour les sélénoprotéines et le modèle murin contrôle (*i.e.* WT) après la lésion musculaire induite par la cardiotoxine (Figure 5C). En outre, dans ces conditions, nous avons identifié une population Ly6C positive intermédiaire au cours de la régénération. Cependant, aucune différence n'a été identifiée en prenant en compte cette nouvelle population Ly6C positive intermédiaire (Figure 5D). De plus, aucune différence entre les groupes n'a été identifiée pour les neutrophiles (Figure 5E).

Puis, nous avons analysé le rôle de ces molécules tout au long de la régénération du muscle squelettique. Le paramètre principal étudié pour évaluer l'efficacité de la régénération musculaire est la surface transversale (CSA) des myofibres, car ce paramètre est corrélé avec la force musculaire (Desgeorges et al., 2019). Ainsi, la CSA des myofibres en régénération chez les souris invalidées pour les sélénoprotéines a été évalué 28 jours post-lésion avec la cardiotoxine (Figure 6A). Les fibres ont été analysées par immunomarquage anti-laminine (un marqueur de la membrane basale). Ensuite l'aire des fibres ont été quantifiées de façon semi-automatique (Desgeorges et al., 2019) (Figure 6B). Aucune différence n'a été observée entre les différents génotypes pour la masse des muscles normalisée avec la masse corporelle des souris (Figure 6C). De plus, la moyenne de la taille des fibres musculaires de ces différents

groupes est identique (Figure 6D). Afin d'analyser le pourcentage de myofibres fusionnées, la quantification du nombre de noyaux par fibre musculaire a été effectuée. Aucune différence significative entre les différents groupes n'a été trouvée, suggérant que le processus de fusion cellulaire nécessaire pour la formation de nouvelles myofibres n'était pas altéré par l'absence de sélénoprotéines dans les macrophages (Figure 6E).

Cependant, de façon intéressante, malgré le fait que la distribution des CSA n'ait pas démontré de différence entre les groupes SEPP KO et WT (Figure 6F), le groupe GPX3 KO a 2 fois plus de petites myofibres (Figure 6G) par rapport au groupe contrôle. De plus, les souris invalidées pour le transport du sélénium par Sepp1 (SEPP TRC) possèdent significativement moins de petites myofibres par rapport au contrôle (Figure 6H). Le groupe de souris pour lesquelles la fonction antioxydante de Sepp1 n'est plus présente (SEPP SER MUT) présente le phénotype inverse (Figure 6I), suggérant que la fonction antioxydante de Sepp1 est impliquée dans le défaut de régénération.

Un autre indicateur pour analyser l'efficacité de la régénération des muscles squelettiques consiste à mesurer la présence de lipides intramusculaires (Bouviere et Trignol et al., 2019). Les progéniteurs fibro-adipogéniques (FAPs), une population de cellules interstitielles mésenchymateuses, peuvent se différencier en adipocytes après une lésion musculaire et augmenter l'accumulation de graisse dans ce tissu (Jia and Sowers, 2019). Ainsi, la persistance de lipides intramusculaires est associée à une altération de la régénération. Le pourcentage lipidique a été quantifié de façon automatique grâce au logiciel Image J, à l'aide d'une macro développée par notre équipe. Une augmentation significative (2 fois) de lipides intramusculaires a été mise en évidence chez les souris GPX3 KO par rapport aux souris contrôle 28 jours après la lésion (Figure 7), suggérant que la glutathion peroxydase 3 puisse réguler la différenciation de FAPs en adipocytes pendant la régénération musculaire.

Bien que Sepp1 et GPX3 ne semblent pas requises pour le changement de phénotype des macrophages pendant la régénération musculaire, l'ensemble de ces résultats suggèrent que ces molécules jouent un rôle direct sur l'homéostasie des myofibres un mois après une lésion induite par un venin de serpent.

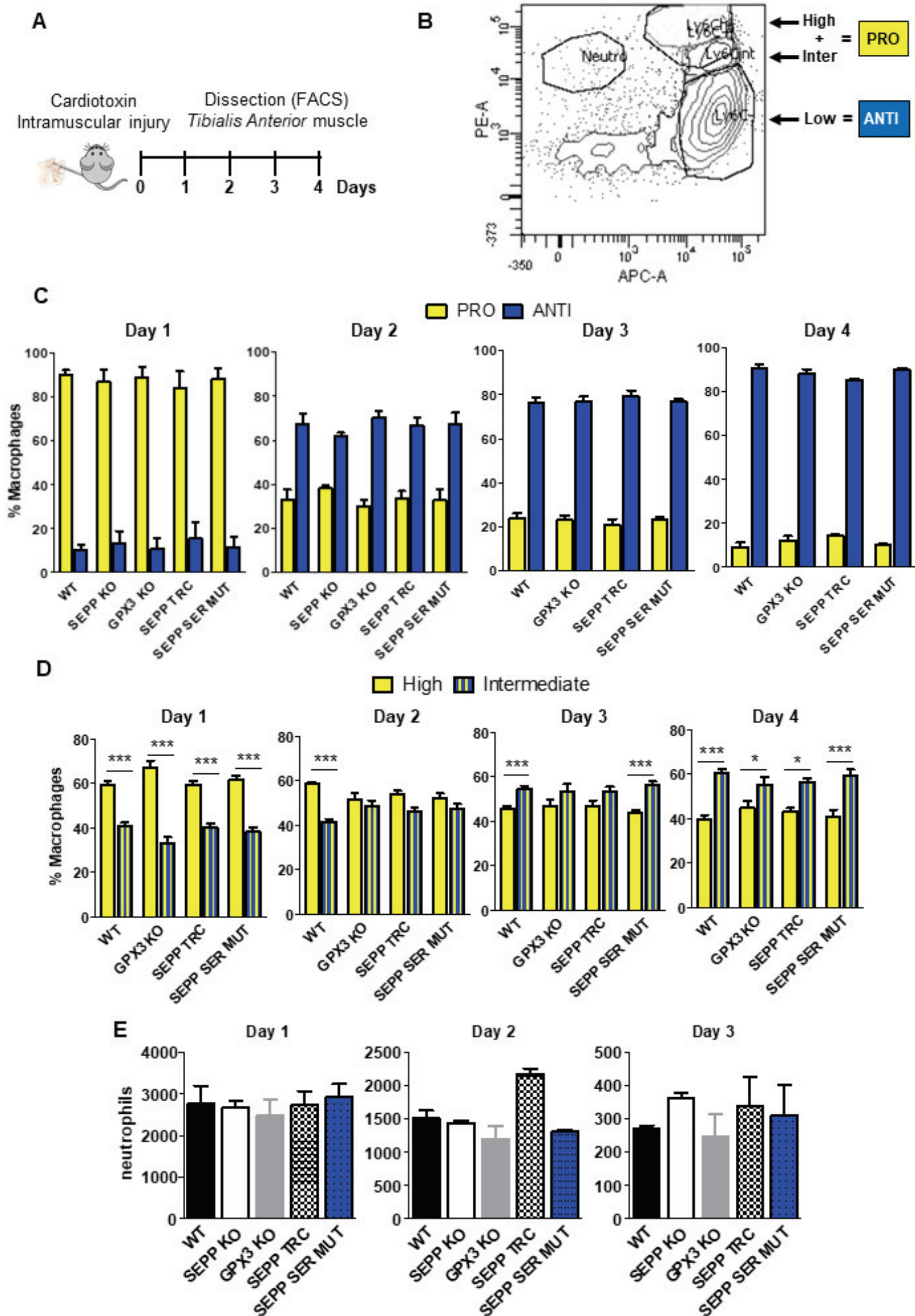


Figure 5 : Les sélénoprotéines ne sont pas requises pour induire un profil pro et anti-inflammatoire des macrophages pendant la régénération musculaire. (A) Afin d'évaluer le rôle des sélénoprotéines sur le changement de phénotype des macrophages *in vivo* pendant la régénération musculaire, le modèle de lésion du muscle *Tibialis Anterior* (TA) induite par la cardiotoxine (CTX). (B et C) Les pourcentages de macrophages pro-inflammatoires, de macrophages anti-inflammatoires, de macrophages intermédiaires (D) et de neutrophiles (E) ont été analysés par cytométrie de flux 1, 2, 3 et 4 jours après l'injection de CTX. (n=6)
Statistique : Test 2way ANOVA

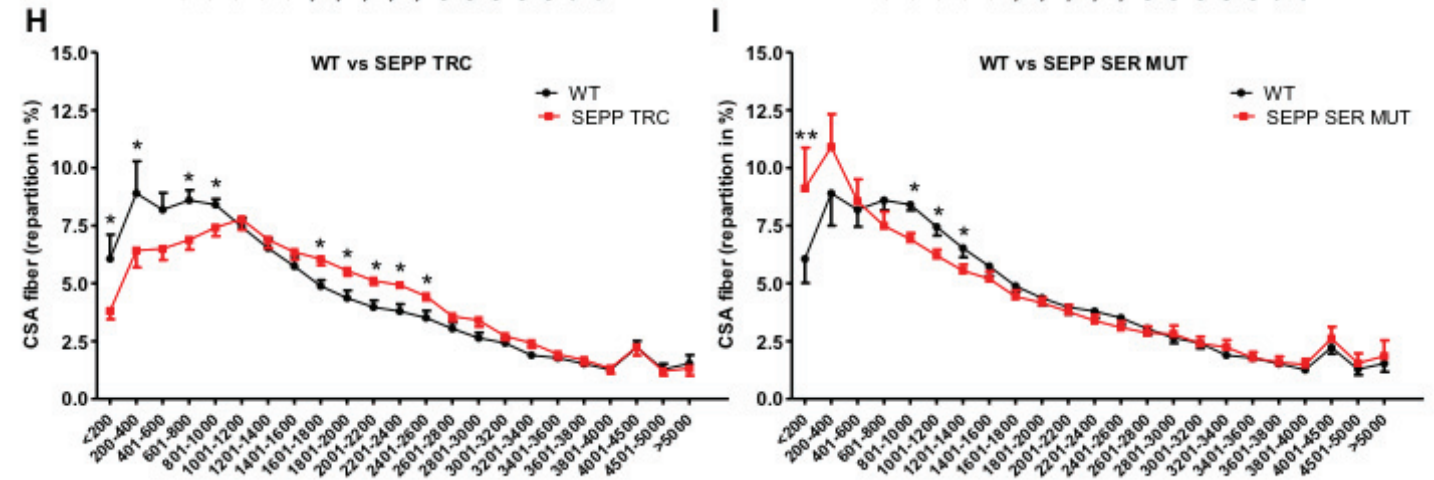
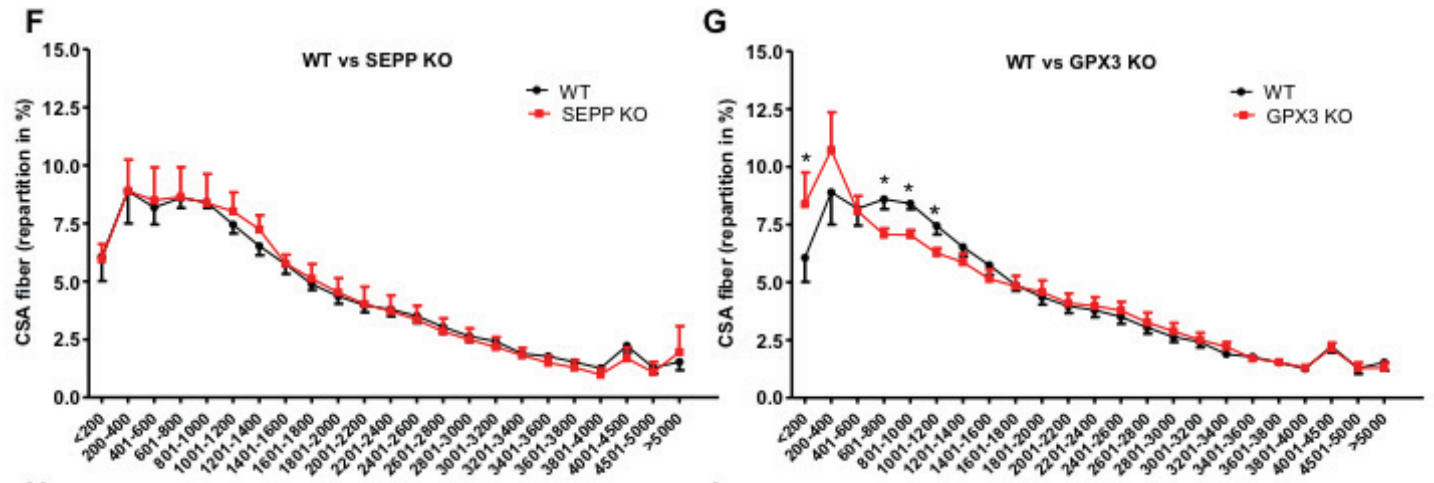
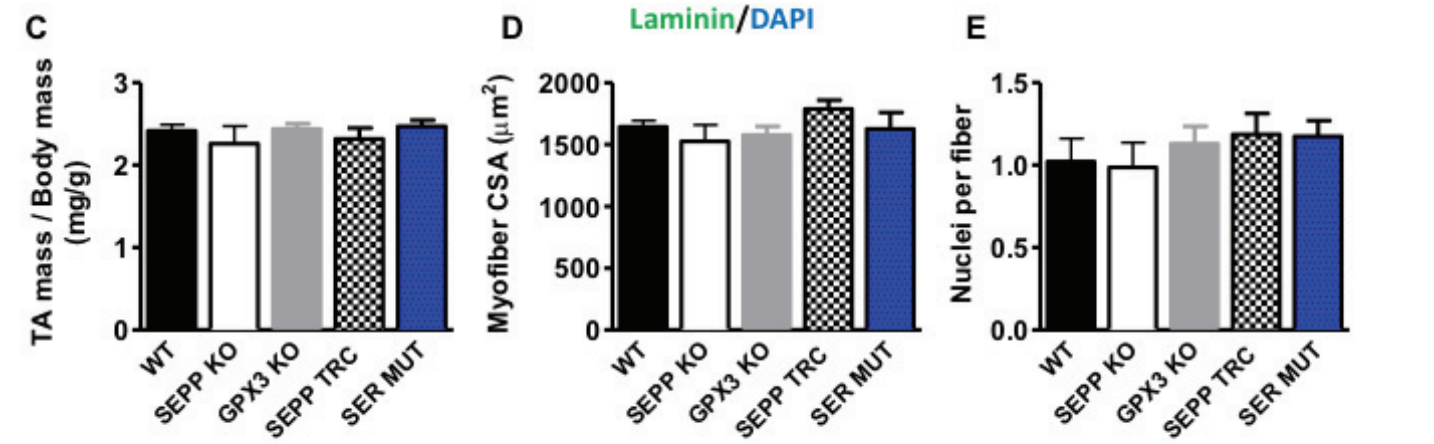
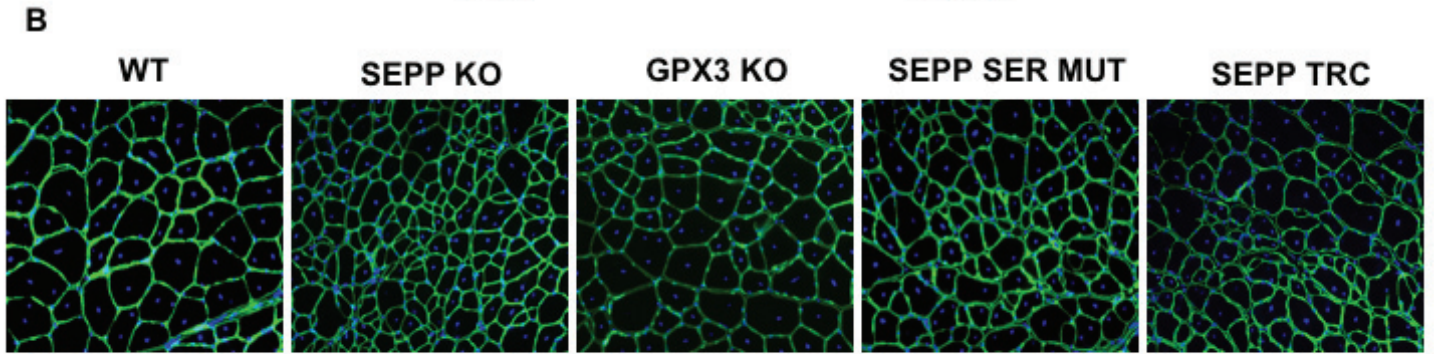
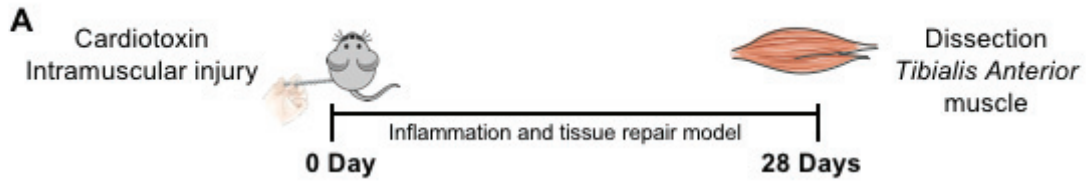


Figure 6 : Les sélénoprotéines sont impliquées dans la régénération du muscle squelettique. (A) Procédure expérimentale d'analyse de la régénération musculaire. Après la cardiotoxine, les muscles ont été prélevés au jour 28. (B) Immunomarquage anti-laminine pour l'analyse de l'aire moyenne transversale (CSA) des fibres musculaires de souris SEPP KO, GPX3 KO, SER MUT et SEPP TRC. (C, D, E) Graphiques représentant le ratio de la masse musculaire sur la masse totale du corps des souris 28 jours post-lésion avec la cardiotoxine (CTX), la moyenne de la CSA 28 jours post-lésion CTX. (E) Graphiques (F) Le graphique représente la distribution des myofibres au jour 28 entre WT et SEPP KO, (G) WT et GPX3 KO, (H) WT et SEPP TRC, (I) WT et SER MUT. * p <0,05 et ** p <0,01 par rapport au WT. (n=8) Statistique : Test 2way ANOVA

A Sudan Black B staining: lipid deposits

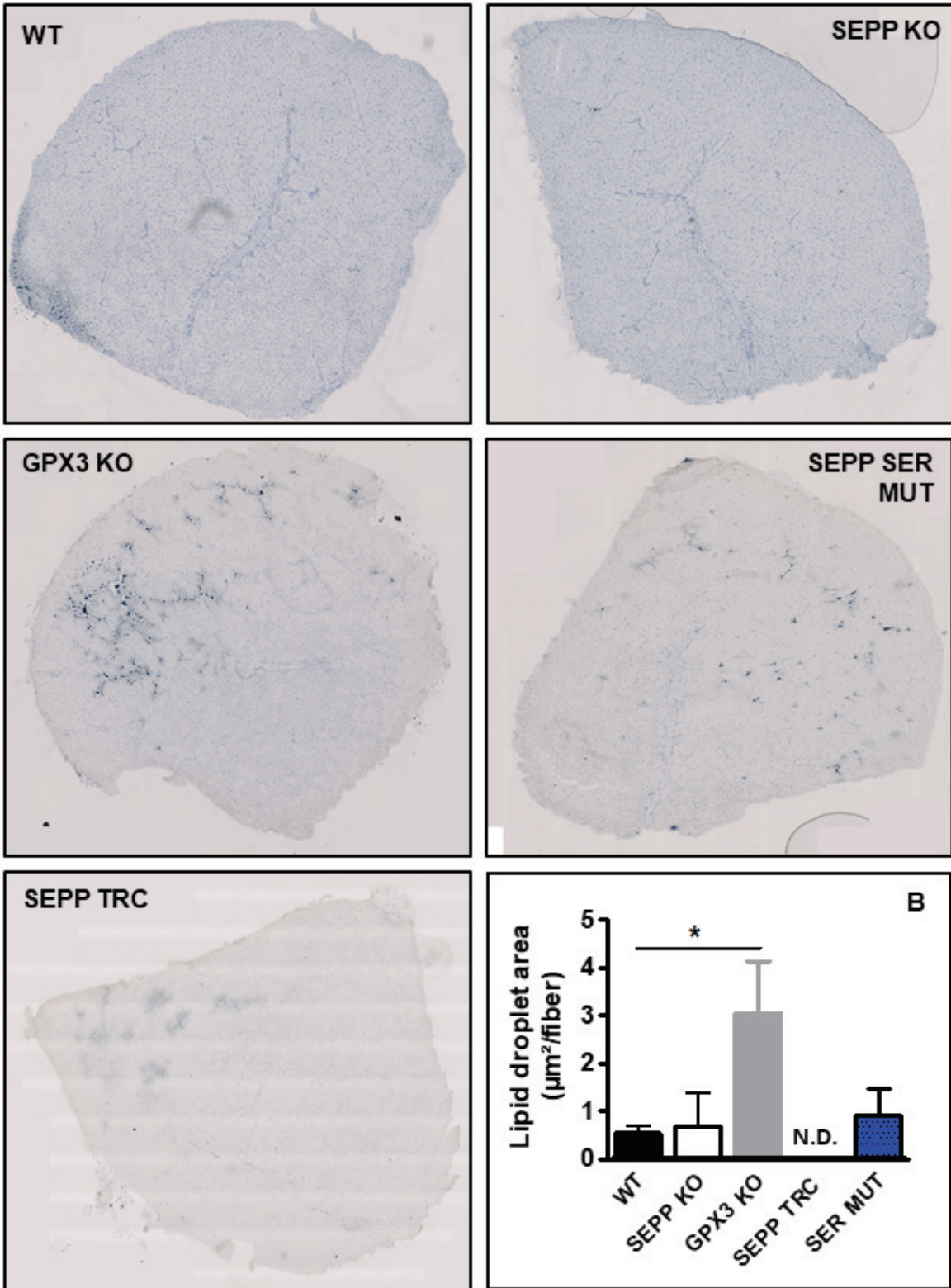


Figure 7 : L'absence de GPX3 augmente les lipides intermusculaires. (A) Vingt-huit jours après une lésion induite par la cardiotoxine, le marquage Noir Soudan a été réalisé sur des muscles *Tibialis Anterior* issus de souris WT, SEPP KO, GPX3 KO, SEPP TRC et SER MUT (B). Le graphique représente l'aire de la fibre musculaire occupée par des lipides. (n=5) Statistique : Test One way ANOVA

L'absence de la sélénoprotéine P dans les macrophages retarde l'acquisition du phénotype anti-inflammatoire in vivo pendant la régénération du muscle squelettique

Afin d'analyser si la sélénoprotéine P (Sepp1) dans les macrophages est capable de réguler la transition du phénotype pro vers anti-inflammatoire pendant la régénération musculaire, nous avons évalué ce paramètre à l'aide d'un modèle où seulement la lignée myéloïde ne dispose pas de Sepp1 (LysM^{fl/fl}; Sepp1^{Cre/+}) (Figure 8A). De plus, la délétion (entre 96 et 100%) du gène *Sepp1* dans les macrophages a été confirmé par PCR (Figure 8B). Lors des deux premiers jours après la lésion musculaire induite par la CTX, les expériences de cytométrie en flux (FACs) montrent que les souris invalidées pour la sélénoprotéine Sepp1 présentent un profil inflammatoire des macrophages identique à celui des souris contrôles (LysM^{fl/fl}; Sepp1^{+/+}) (Figures 8C, D, E). Cependant, de façon intéressante, le groupe LysM^{fl/fl}; Sepp1^{Cre/+} présente 10% de plus de macrophages pro-inflammatoires par rapport au groupe contrôle 3 et 4 jours après la blessure (Figure 8E), ce qui indique que la sélénoprotéine P dans les macrophages est nécessaire pour l'acquisition complète du phénotype anti-inflammatoire pendant la régénération musculaire.

De plus, dans ces conditions, comme nous avons identifié une population Ly6C positive intermédiaire au cours de la régénération, elle a été analysée en absence de Sepp1 dans les macrophages. En prenant en compte cette nouvelle population Ly6C positive intermédiaire, la population Ly6C positive pro-inflammatoire est toujours augmentée dans le groupe LysM^{fl/fl}; Sepp1^{Cre/+} 3 jours et 4 jours après la lésion induite par CTX (Figure 8F), suggérant que les macrophages dépourvus de Sepp1 présentent un défaut d'acquisition du phénotype anti-inflammatoire. Enfin, les neutrophiles ont été analysés pendant les 4 jours de régénération sans aucune différence significative entre les groupes (Figure 8G).

De plus, en utilisant le même modèle de lésion induite par la CTX (Figure 9A) aucune différence n'a été observée pour la masse des muscles de ces souris, la moyenne de la CSA et le nombre de noyau par fibre (Figures 9B, C, D, E). Cependant, l'évaluation de la distribution

des myofibres 28 jours après la blessure nous a permis d'identifier que dans le groupe $LysM^{fl/fl}; Sepp1^{Cre/+}$ les myofibres présentent une diminution des fibres par rapport au contrôle (Figure 9F), suggérant que la cinétique de la régénération est modifiée en absence de Sepp1 dans les macrophages. Enfin, afin d'étudier la présence de lipides intramusculaires, un indicateur de mauvaise régénération musculaire, nous avons réalisé une coloration au Noir Soudan qui nous a permis d'identifier une tendance pour le groupe $LysM^{fl/fl}; Sepp1^{Cre/+}$ à accumuler plus lipides dans les muscles (Figure 9G, H).

In vivo model of skeletal muscle regeneration

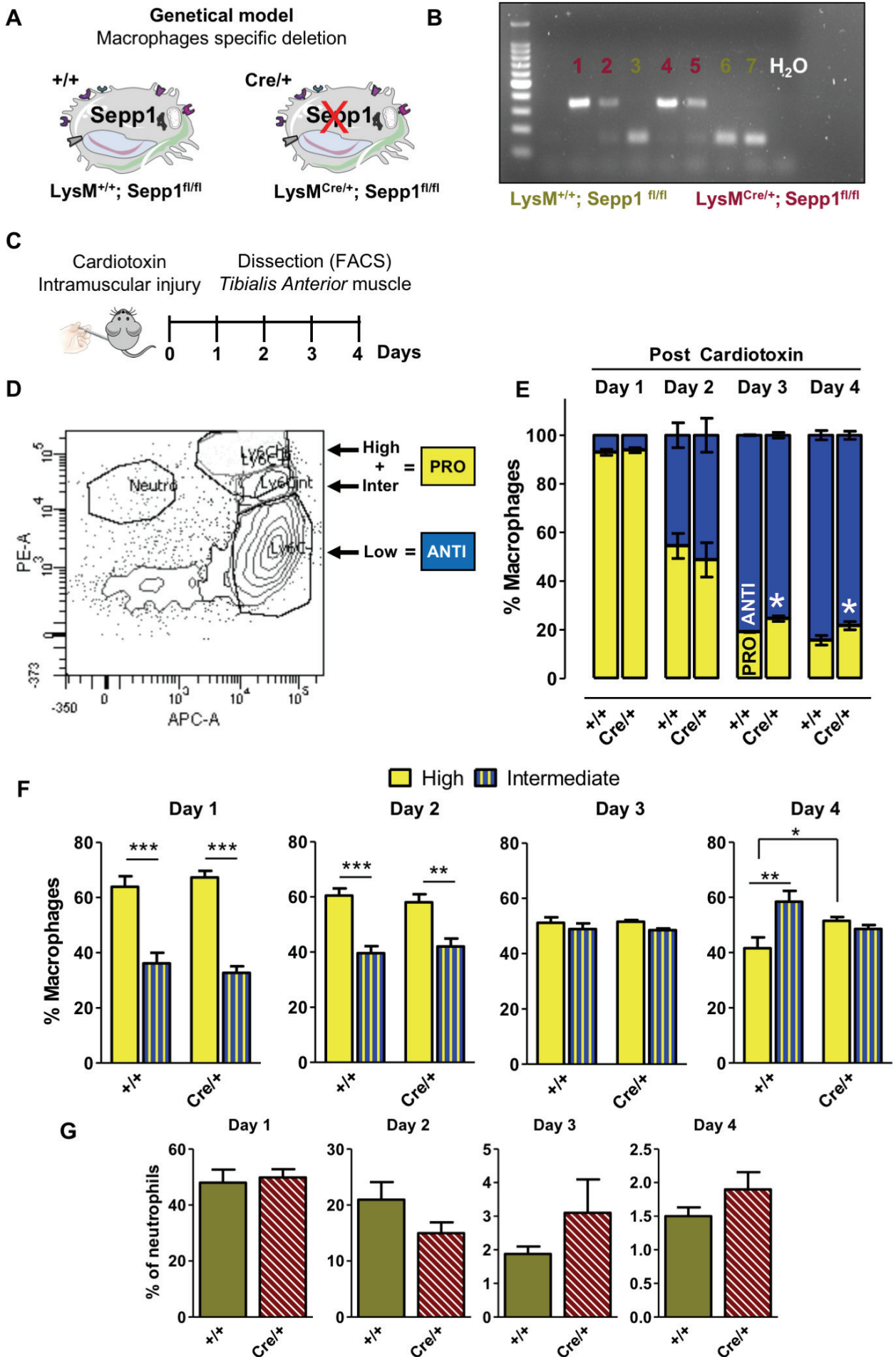


Figure 8 : La sélénoprotéine P dans les macrophages est requise pour induire un profil pro et anti-inflammatoire des macrophages. (A) Afin d'évaluer l'importance de la sélénoprotéine P endogène sur le changement de phénotype des macrophages *in vivo* pendant la régénération musculaire, le modèle de souris LysM^{fl/fl}; Sepp1^{Cre/+} a été établi et la délétion de Sepp1 dans les macrophages a été contrôlé par PCR (B). (C) Le modèle de lésion induite par la cardiotoxine a été utilisé et les muscles tibialis antérieur (TA) ont été évalués pendant plusieurs jours ainsi que les populations pro, intermédiaires et anti-inflammatoires (D). (E) Le pourcentage de macrophages pro-inflammatoires et anti-inflammatoires ont été analysés par FACs 1, 2, 3 et 4 jours après l'injection CTX. (F) La population pro et intermédiaire a été démontré 1, 2, 3 et 4 jours après l'injection CTX et les neutrophiles (G). (n=6) Statistique : 2way ANOVA

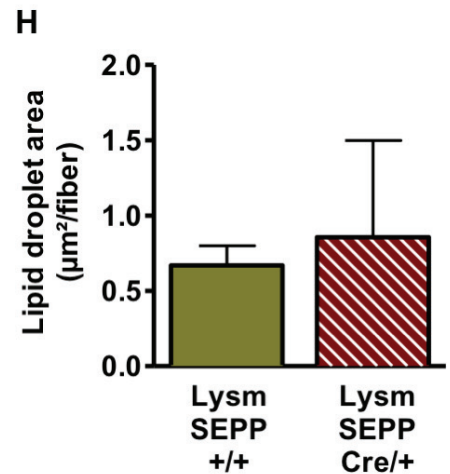
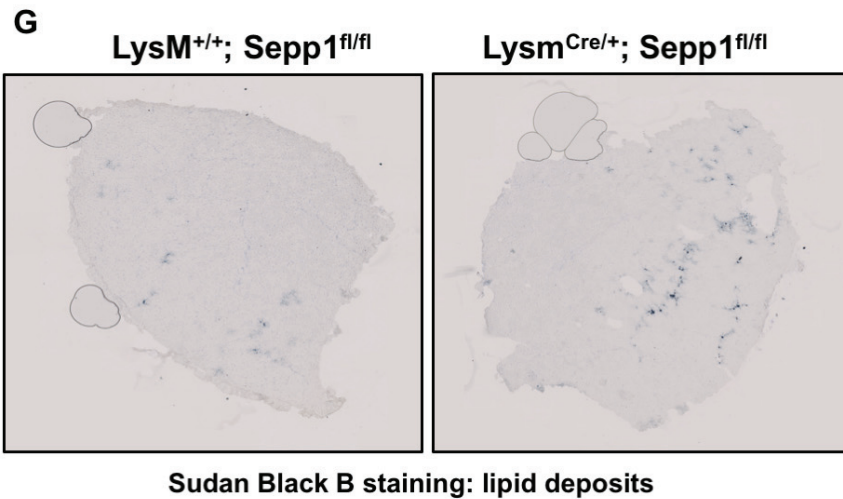
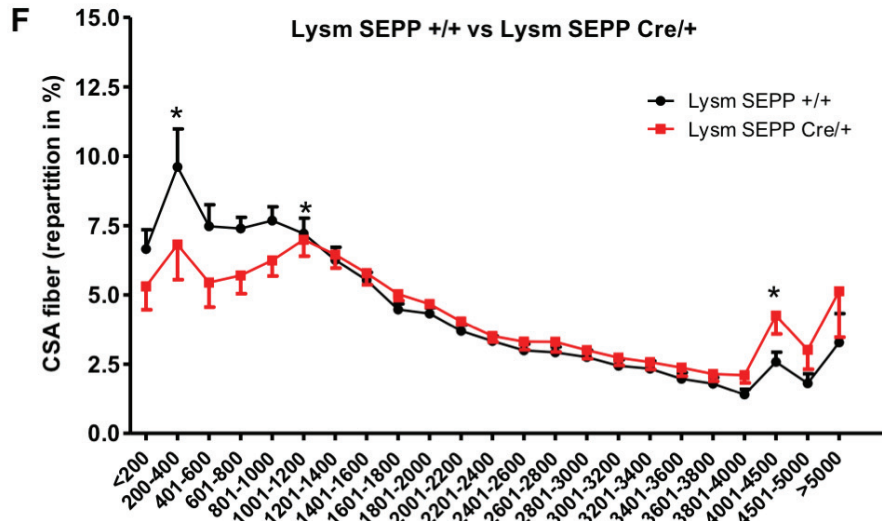
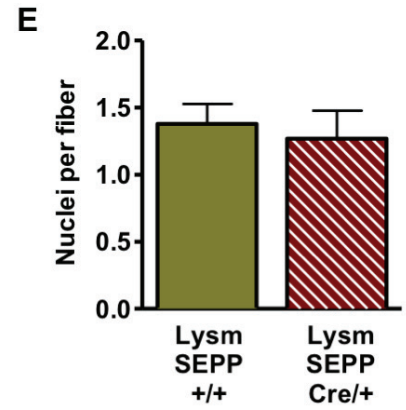
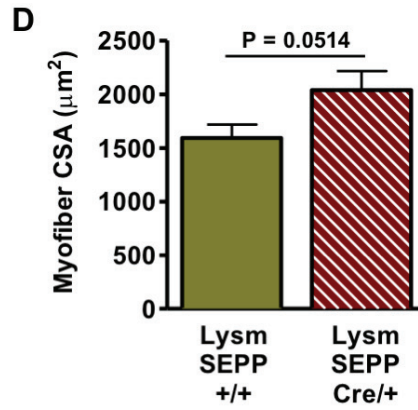
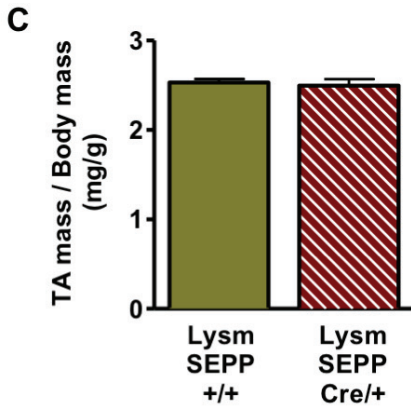
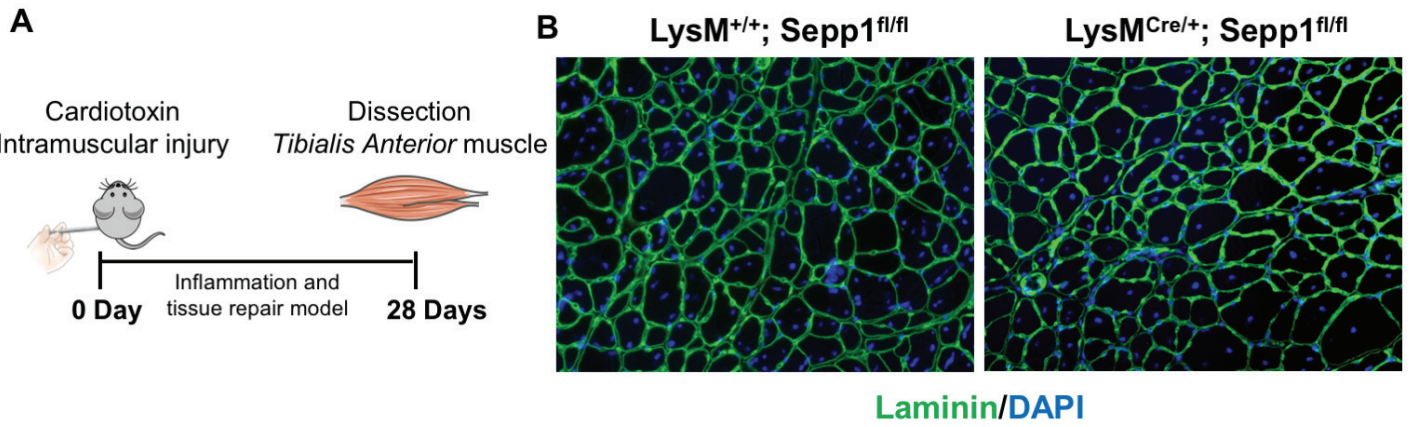


Figure 9 : La sélénoprotéine P dans les macrophages modifie la régénération musculaire. (A) Afin d'évaluer le rôle de la sélénoprotéine P dans les macrophages sur le muscle squelettique au cours de la régénération musculaire, les muscles ont été prélevés 28 jours après une lésion induite par de la cardiotoxine (CTX). (B) Immunomarquage anti-lamine pour l'analyse de l'aire moyenne transversale (CSA) des souris $LysM^{fl/fl}; Sepp1^{+/+}$ et $LysM^{fl/fl}; Sepp1^{Cre/+}$. (C) Graphiques représentant le ratio de la masse musculaire sur la masse totale du corps des souris 28 jours post-lésion avec CTX. (D) Valeur de la moyenne de la CSA 28 jours post-lésion CTX. (E) Le graphique représente la fusion de myofibres *in vivo*. (F) Le graphique représente la distribution des myofibres au jour 28 entre $LysM^{fl/fl}; Sepp1^{+/+}$ et $LysM^{fl/fl}; Sepp1^{Cre/+}$. (G et H) Les photos et les graphiques représentent l'analyse de la présence de lipides intramusculaires. * $p < 0,05$ par rapport au WT (n=6) Statistique : 2way ANOVA

La voie Wnt / β -caténine régule l'expression des sélénoprotéines dans les macrophages

Afin de déterminer le mécanisme de régulation des sélénoprotéines dans les macrophages une collaboration a été établie avec Fabien Le Grand, qui a identifié récemment une réduction de l'expression de deux transcrits d'intérêt (Sepp1 et GPX3) selon l'état de différenciation des cellules musculaires. En effet, les cellules satellites triées ($Vcam1^+$; $CD31^{-45-11B^{-}}$) à différents temps après une blessure ont une expression des sélénoprotéines qui diminuent tout au long du processus de différenciation cellulaire, alors que la voie Wnt/beta-catenin est activée et augmente au cours de cette étape. Pour cette raison, nous avons émis l'hypothèse que la voie de signalisation Wnt/ β -caténine et les sélénoprotéines pourraient être interconnectées également dans les macrophages pour réguler l'acquisition de leurs différents phénotypes et par conséquent leurs fonctions paracrines. Nous avons étudié le rôle de la voie de signalisation Wnt / β -caténine dans ce contexte après traitement par un activateur (CHIR). Nous avons observé que 6h et 24h après le traitement avec CHIR, le gène Sepp1 est moins exprimé par rapport au contrôle (DMSO). Après 6h de traitement avec CHIR, le gène de la GPX3 est aussi moins exprimé par rapport au contrôle (DMSO) (Figure 10), suggérant que Sepp1 et GPX3 sont régulés par cette voie de signalisation dans les macrophages.

Selenoproteins – Wnt/ β -catenin signaling

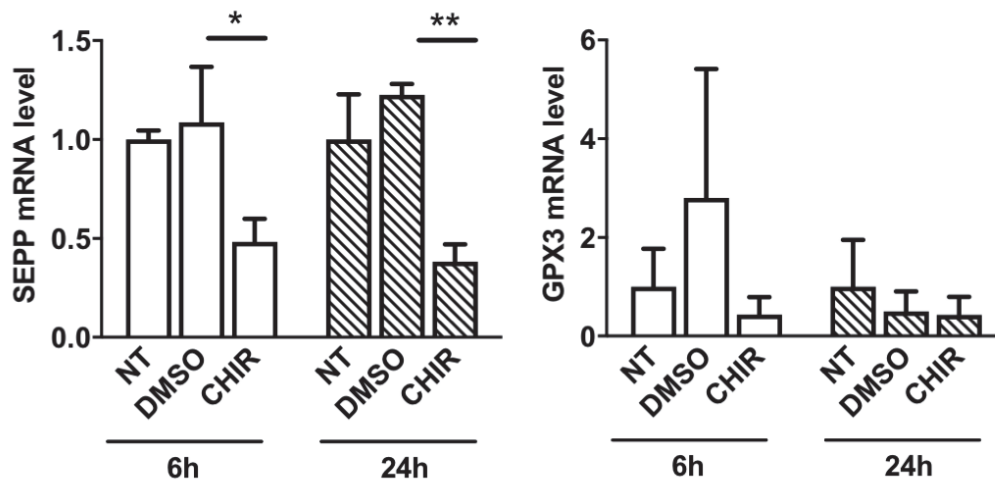


Figure 10 : *Wnt / β -catenine* régule les sélénoprotéines dans les macrophages. Le graphique représente les macrophages sans traitement (NT), traité avec DMSO (DMSO) ou traité avec l'activateur de la Wnt/ β -catenine, CHIR dilué dans du DMSO (CHIR). Les macrophages ont été traités pendant 6 ou 24h. (n=3) Statistique : Test 2way ANOVA

Discussion

Les différentes facettes des molécules Sepp1 et GPX3 : modulateurs paracrins des cellules précurseuses myogéniques et autocrins dans les macrophages

La nouveauté de nos travaux repose sur la démonstration du nouveau rôle des molécules Sepp1 et GPX3, antioxydantes, qui agissent sur l'adaptation cellulaire puisqu'elles régulent l'équilibre entre la production et l'élimination des espèces dérivées de l'oxygène (ROS) ainsi que le transport du sélénium. Définir le rôle de ces molécules dans la plasticité des macrophages et la régénération musculaire conduit à une avancée significative dans la compréhension des facteurs capables de réguler les différents phénotypes des macrophages dans le cadre d'une inflammation stérile. Dans cette étude, nous montrons que les sélénoprotéines des macrophages promeuvent *in vitro* la fusion des précurseurs myogéniques et à la formation de myotubes. Cependant, nous n'avons pas analysé l'effet direct de ces sélénoprotéines sur les précurseurs myogéniques.

L'hypothèse d'un rôle direct est tout à fait envisageable, puisqu'il a été déjà démontré l'importance de la régulation des ROS dans différentes étapes de la myogenèse. Par exemple, les ROS oxydent les cystéines clés de kinases comme ERK ou AMPK, un processus qui les active (Zhang et al., 2016 ; Morales-Alano and Calbet 2016). En effet, la translocation nucléaire d'ERK persiste pendant toute la phase G1 de la prolifération, soulignant son importance dans cet événement cellulaire. Par ailleurs, les enzymes antioxydantes comme la GPX3 modulent la signalisation dépendante de ces kinases par des signaux d'oxydo-réduction (An et al., 2018). Ainsi, il est envisageable qu'en absence de Sepp1 et de GPX3 (*i.e.* en présence d'une quantité exacerbée de ROS) : 1) la prolifération des précurseurs myogéniques puisse être augmentée ; 2) la phase G1 (de la prolifération) du cycle cellulaire soit prolongée ; 3) la différenciation et fusion de précurseurs myogéniques soient réduites. Cette hypothèse vient corroborer nos résultats où la co-culture, entre le milieu des macrophages anti-inflammatoires dépourvus de la protéine Sepp1 ou de la protéine GPX3 et les précurseurs myogéniques sains, augmente la prolifération et réduit la fusion de ces derniers.

Une autre fonction particulière de la Sepp1 est le transport du sélénium, qui dans cette étude a été évalué par le modèle SEPP TRC, où la portion C-terminale de cette protéine responsable de cette fonction a été abolie. Nos résultats de co-culture ont montré qu'en absence de sélénium les macrophages pro-inflammatoires réduisent la prolifération des précurseurs myogéniques. Dans ce contexte, il a été démontré que le sélénium a des effets anti-prolifératifs dans les cellules cancéreuses (Zhang et al., 2013). Le mécanisme est dû à l'induction de la translocation

de l'AMPK par le sélénium dans le noyau de ces cellules qui empêche l'accumulation de la β -caténine dans celle-ci, suggérant que les effets antiprolifératifs cellulaires du sélénium sont médiés par la voie AMPK/ β -caténine (Park et al., 2016). Ce fait souligne l'hypothèse d'un effet trophique du sélénium sur les précurseurs myogéniques.

Dans cette étude, nous avons vérifié l'hypothèse d'un rôle indirect de SEPP1 et GPX3 sur la myogenèse à partir de la régulation du phénotype des macrophages. Nous avons trouvé, qu'en absence de Sepp1 et GPX3, les macrophages réduisent leur habilité à acquérir les phénotypes inflammatoires. La cytokine IFN γ utilisé pour induire *in vitro* un phénotype M1 contrôle la polarisation des macrophages par la signalisation de Jak-STAT. Il a été démontré que l'IFN- γ réprime les gènes cibles d'importance pour la transition de M1 vers M2. Un des gènes les plus réprimés est la Sepp1 (Kang et al., 2017), ce qui suggère l'implication de cette sélénoprotéine dans l'acquisition du phénotype M2 par les macrophages, corroborant ainsi nos résultats. De façon intéressante, nous avons également montré qu'en plus de réguler le phénotype M2, Sepp1 ainsi que GPX3 sont aussi capables de réguler le phénotype M1. Des expériences sur l'expression de gènes cibles de M1 (*e.g.* TNF α) démontre une expression plus faible dans les macrophages Sepp1 dépourvus de l'activité peroxydase (SER MUT) ou du transport du sélénium (SEPP TRC). De plus, au niveau protéique, d'autres marqueurs M1 pro-inflammatoires (iNOS et CCL3) sont plus exprimés dans les macrophages Sepp 1 et GPX3 KO polarisés avec l'IL10 (M2). En outre, les marqueurs M2 anti-inflammatoires (CD206 et CD163) sont aussi plus exprimés dans les macrophages M1, confirmant notre hypothèse selon laquelle les macrophages n'acquièrent que partiellement les phénotypes pro et anti-inflammatoires en absence de ces sélénoprotéines.

Les études *in vivo* sur le phénotype des macrophages ont confirmé les résultats *in vitro*. Des études précédentes de notre équipe ont montré qu'après une blessure, les monocytes du sang infiltrent le muscle endommagé et se différencient en macrophages pro-inflammatoires (Ly6C^{pos}). Ils stimulent la prolifération des myoblastes et inhibent leur fusion. Ensuite, les macrophages pro-inflammatoires acquièrent le phénotype anti-inflammatoire (Ly6C^{neg}) afin de stimuler la fusion de myofibres et exercent ainsi des rôles trophiques séquentiels sur la myogenèse tout au long de la régénération musculaire (Saclier et al., 2003 ; Arnold et al., 2007 ; Mounier et al., 2013). Dans ce travail, nous avons montré *in vivo* que dans le modèle murin pour lequel Sepp1 est invalidé seulement dans les macrophages, le nombre de cellules Ly6C^{high} (population pro-inflammatoire) à 3 et 4 jours post-lésion cardiotoxine (CTX) est significativement augmenté par rapport à un modèle murin contrôle, indiquant un retard de la

transition du phénotype pro vers anti-inflammatoire pour les macrophages dépourvus de Sepp1 ou de GPX3.

Sepp1, une molécule régulatrice d'une nouvelle sous-population de macrophages pendant la régénération musculaire

Une population intermédiaire (Ly6C^{interm}) a été identifiée dans les groupes évalués dans cette étude. Trois et quatre jours après une lésion musculaire, l'absence de Sepp1 dans les macrophages a été également capable de réduire cette population intermédiaire. Malgré le fait que cette population ne soit pas encore décrite dans le cadre de la régénération musculaire, elle l'a déjà été dans la régénération du rein (Clements et al., 2016). De façon intéressante, il a été démontré que, parmi les gènes impliqués dans l'inflammation, l'expression du récepteur Trem est fortement augmentée. Récemment, la signalisation de Trem a été identifiée comme une voie majeure par laquelle les macrophages répondent à l'homéostasie lipidique au niveau des tissus, soulignant que Trem2 est un capteur clé des pathologies métaboliques dans de multiples tissus et également une cible thérapeutique potentielle (Jaitin et al., 2019). Dans notre étude, en absence de Sepp1 dans les macrophages, les muscles ont une tendance à accumuler des lipides intramusculaires. Ainsi, le fait que les macrophages déficients pour Sepp1 présentent une population moindre de Ly6C^{interm} et, comme il a été déjà démontré que cette population présente une expression élevée de Trem (corrélée à l'homéostasie lipidique) dans la régénération du rein, ce mécanisme pourrait expliquer le phénotype d'accumulation lipidique intramusculaire observée lors de la régénération musculaire d'un modèle murin dans lequel Sepp 1 est invalidé seulement dans les macrophages. De plus, ces résultats pourraient aider à élucider le rôle des sélénoprotéines des macrophages dans les maladies inflammatoires comme l'obésité.

Le phénotype musculaire modulé par le sélénium et les sélénoprotéines

La privation en sélénium a été associée à différentes pathologies chez l'homme, notamment les dystrophies musculaires blanches (également appelés dystrophies musculaires nutritives) caractérisées par la fatigue, une faiblesse musculaire, des troubles de la mobilité et des problèmes cardiaques (Rayman, 2012). Étant donné que le sélénium est nécessaire à la biosynthèse et à l'activité des sélénoprotéines, de nombreuses études épidémiologiques ont examiné si les gènes de la sélénoprotéine pouvaient être impliqués dans des maladies humaines associées à une carence en sélénium (Bellinger et al., 2009). À ce jour, seules les mutations de

la sélénoprotéine N (SEPN1) ont directement provoqué des troubles du muscle squelettique (Castets et al., 2011). Dans notre étude, nous avons identifié que l'absence de GPX3 peut réguler la régénération musculaire par l'augmentation du nombre des petites fibres 28 jours post-lésion CTX. Cependant, de façon intéressante le phénotype est inversé en absence du transport du sélénium (SEPP TRC). Nous avons trouvé une augmentation de l'aire de section transversale (CSA) dans ce groupe par rapport au contrôle.

Ce résultat pourrait être dû à une régulation entre le sélénium et la voie Wnt/ β -caténine. La β -caténine activée est associée à la croissance cellulaire par sa fonction bien caractérisée en tant que facteur de transcription (Moon et al., 2002). Dans le noyau, la β -caténine peut former un complexe de transcription avec les membres de la famille du facteur de lymphocytes T (Lef-1) et par la suite favoriser l'expression de gènes cibles (Novak et al., 1998). Les gènes c-Myc et cycline D1 (Shtutman et al., 1999) sont, par exemple, deux cibles de transcription importantes de la β -caténine corrélées à la croissance cellulaire. De plus, en l'absence de signalisation Wnt, la β -caténine libre est phosphorylée par la glycogène synthase kinase-3 β (GSK-3 β) et rapidement ciblée pour la dégradation protéosomique (Amit et al., 2002 ; Gao et al., 2014). Il a été démontré que plusieurs voies de signalisation induisent la phosphorylation de GSK-3 β dans d'autres types de cellules (Kang et al., 2004 ; Doble et al., 2003). Cependant, les études sur la voie Wnt dans le muscle squelettique se sont concentrées sur l'activation de la voie de réponse à l'insuline phosphatidylinositol 3-kinase/Akt (PI3K/Akt) et sur le facteur de croissance analogue à l'insuline (IGF-1) (Rommel et al., 2001 ; Vyas et al., 2002). Il est intéressant de noter que l'hypertrophie des muscles squelettiques est associée à la signalisation de l'IGF-1 et à l'activation d'Akt (Bodine et al., 2001, Egerman et al., 2014). À l'appui de ce modèle, il a été démontré que la phosphorylation de GSK-3 β médiée par l'Akt activait la β -caténine pendant l'hypertrophie des cardiomyocytes, soulignant l'importance de l'activation de la voie Wnt/ β -caténine pour l'hypertrophie (Haq et al., 2003). Cependant, une des molécules cible du sélénium est la β -caténine. Il a été démontré que le sélénium inhibe la phosphorylation de la GSK3 β sur la serine 9 et de la β -caténine sur la serine 552. De plus, l'AMPK qui a été induite par le sélénium a entraîné la localisation nucléaire atténuée de la β -caténine (Park et al., 2015). Ainsi, comme le sélénium est un inhibiteur de la voie Wnt/ β -caténine, cruciale pour l'hypertrophie, en absence de ce minéral, cette voie peut être activée de façon prolongée, ce qui pourrait expliquer nos résultats d'hypertrophie musculaire dans notre modèle SEPP TRC et $LysM^{fl/fl}; Sepp1^{Cre/fl}$. Il est à noter que nous avons identifié des fibres plus petites en absence de l'activité antioxydante de Sepp1 (SER MUT), soulignant que seul le transport du sélénium serait impliqué sur le mécanisme d'hypertrophie. Afin de comprendre le rôle des fonctions antioxydantes et du

transport du sélénium de *Sepp1* dans les macrophages *in vivo*, des expérimentations de transplantation de moelle osseuse de nos souris SEPP TRC et SER MUT dans des souris WT seront effectuées.

La possible régulation de *Sepp1* et *GPX3* dans les macrophages par la voie de signalisation *Wnt/β-caténine*

Dans notre travail, nous avons montré que l'expression de *Sepp1* dans les macrophages a été plus faible par rapport au contrôle (DMSO) 6h ou 24h après un traitement avec un activateur de la *Wnt/β-caténine* (CHIR). Nous avons également observé une expression plus faible de l'expression génique de *GPX3* par rapport au contrôle (DMSO), 6h post-traitement avec ce même activateur. Cependant, il a été déjà démontré que le DMSO est capable de produire des ROS, comme le peroxyde d'hydrogène (Kwak et al., 2010). Sachant que le rôle majeur de la *GPX3* en tant qu'une enzyme antioxydante est de convertir le peroxyde d'hydrogène en eau (Halliwell et al., 2006) afin de maintenir l'homéostasie cellulaire, il n'est pas surprenant que son expression soit augmentée 6h après la présence de DMSO dans le milieu de culture.

Il a été déjà démontré que la voie *Wnt/β-caténine* dans les macrophages est impliquée dans l'obtention phénotype M2 anti-inflammatoire. De plus, dans les macrophages, elle est également associée au développement cardiaque, la réponse aux lésions cardiaques et à la réparation du tissu (Palevski et al., 2017). Le premier résultat obtenu dans cette étude nous a permis de démontrer une première évidence de la régulation de *Sepp1* par la voie *Wnt/β-caténine* dans les macrophages. Ainsi, grâce à une collaboration au sein de l'Institut NeuroMyogène, nous essayons actuellement d'élucider le mécanisme par lequel cette voie est impliquée dans la régulation de la transition des différents phénotypes inflammatoires des macrophages par la sélénoprotéine P.

En conclusion, mon travail de doctorat a permis d'identifier pour la première fois l'influence des sélénoprotéines *Sepp1* et *GPX3* dans les macrophages sur les étapes de la myogenèse *in vitro* ainsi que leur importance pour l'acquisition d'un phénotype pro et anti-inflammatoire par les macrophages *in vitro* et *in vivo*. De plus, ce phénomène semble être modulé par la voie de signalisation de la *Wnt/β-caténine*.

Perspectives

La sélénoprotéine P est-elle capable d'induire les différents phénotypes des macrophages via la régulation de GPX3 et l'activation de l'AMPK ?

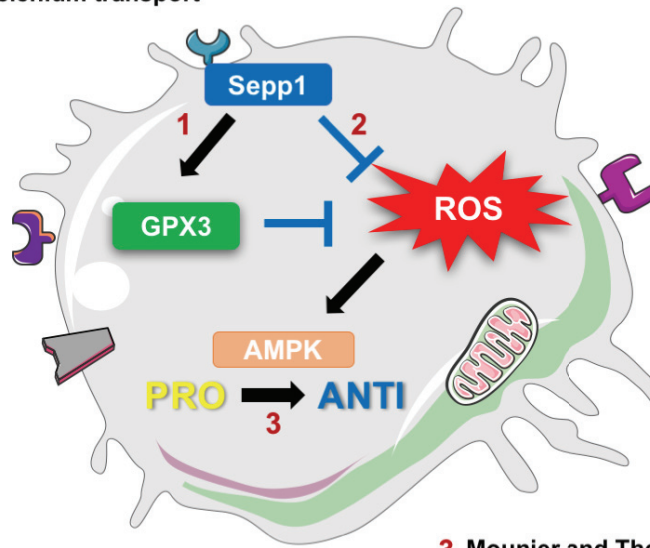
Notre travail a fourni des preuves du rôle de la régulation des sélénoprotéines dans le phénotype des macrophages et ses fonctions pendant la myogenèse. Nous avons montré que la voie Wnt/ β -caténine pourrait contrôler l'expression de ces molécules. Cependant, le mécanisme par lequel les sélénoprotéines agissent sur les macrophages reste encore inconnu. Récemment, il a été démontré que l'activation de l'AMPK est nécessaire pour l'acquisition *in vitro* et *in vivo* du phénotype anti-inflammatoire des macrophages au cours de la régénération du muscle squelettique (Mounier et al., 2013). De plus, il a été déjà démontré qu'un dérivé réactif de l'oxygène (ROS), peroxyde d'hydrogène, oxyde les cystéines 299 et 304 de l'AMPK (Morales-Alano and Calbet 2016) puis l'active, ce qui suggère qu'une signalisation abolie des ROS peut empêcher la phosphorylation de l'AMPK. Pour cette raison, nous avons émis l'hypothèse que la GPX3, enzyme antioxydante responsable de la conversion du peroxyde d'hydrogène en eau, peut atténuer cette signalisation dépendante de ROS dans les macrophages et par conséquent réduire la phosphorylation de l'AMPK. La Sepp1 est également capable d'agir comme une enzyme antioxydante grâce à son activité peroxydase (Kurokawa et al., 2014) et par conséquent éliminer le peroxyde d'hydrogène en présence. De plus, le deuxième rôle connu de la Sepp1 est celui de transporter le sélénium, nécessaire pour la synthèse d'autres sélénoprotéines comme la GPX3. Ainsi, la Sepp1 peut réguler l'AMPK *via* le contrôle de la production de ROS de façon indirecte par la synthèse de la GPX3 ou directement par son activité antioxydante (Figure 11A). Afin de vérifier l'hypothèse du rôle indirect de Sepp1 sur les ROS, nous avons comparé l'expression de GPX3 dans des macrophages contrôles (WT), des macrophages ne pouvant pas transporter le sélénium (SEPP TRC) et des macrophages ayant une activité antioxydante altérée (SEPP MUT). La réduction de l'expression de GPX3 dans le groupe SEPP TRC confirme notre hypothèse. En effet, les résultats nous ont permis d'identifier qu'en absence de transport du sélénium (SEPP TRC), le gène de la GPX3 dans les macrophages pro-inflammatoires M1 (induit par $IFN\gamma$) est moins exprimé par rapport au groupe SEPP MUT. Cependant, ce gène est plus exprimé dans les macrophages SEPP TRC par rapport aux macrophages contrôles (Figure 11B). Ainsi, nous avons analysé l'expression de la protéine GPX3 afin de comprendre si le transport du sélénium peut affecter sa régulation post-transcriptionnelle. Les résultats montrent une réduction de l'expression de GPX3 dans les macrophages SEPP TRC, par rapport aux macrophages contrôles et aux macrophages SEPP MUT.

(Figure 11C), ce qui confirme l'hypothèse selon laquelle Sepp1, grâce à sa fonction de transport du sélénium, puisse agir de façon indirecte sur les ROS pour la régulation de la GPX3.

Afin de déterminer si les sélénoprotéines Sepp1 et GPX3 et l'AMPK sont interconnectées dans les macrophages pour induire leurs différents phénotypes et par conséquent leurs fonctions paracrines, nous avons étudié la voie de signalisation de l'AMPK après traitement par l'IFN γ des macrophages. Des résultats préliminaires montrent qu'en absence de Sepp1 et de GPX3, les macrophages pro-inflammatoires présentent une nette diminution de la phosphorylation de l'AMPK. Cette même expérience a permis d'évaluer qu'après un traitement avec les activateurs de l'AMPK, *damage-associated molecular patterns* (DAMPs) et AICAR, les macrophages déficients pour les sélénoprotéines n'étaient pas en mesure d'activer l'AMPK par rapport aux macrophages contrôles (Figure 11D), suggérant que Sepp1 et GPX3 peuvent contrôler le changement de phénotype des macrophages *via* l'AMPK.

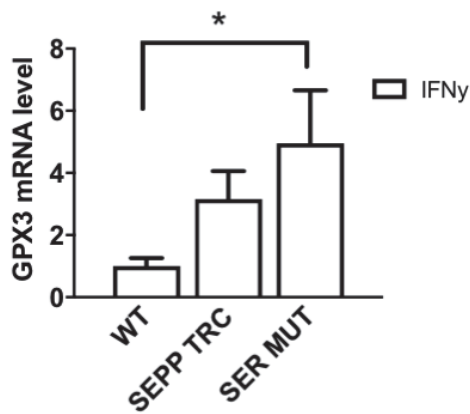
Selenoproteins - AMPK

A **1** Indirect Antiox. Activity
Selenium transport **2** Direct Antiox. Activity

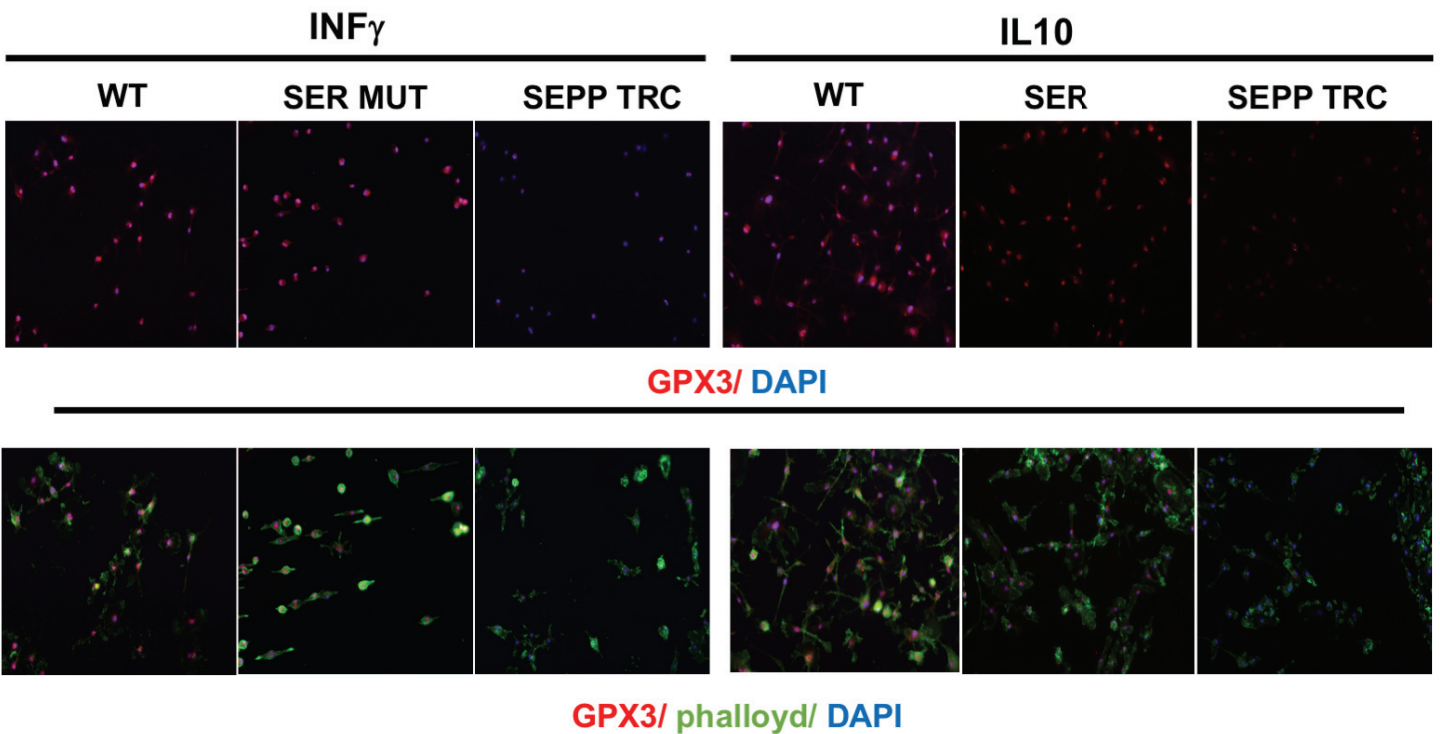


3 Mounier and Theret et al *Cell Metab* 2013

B



C



D

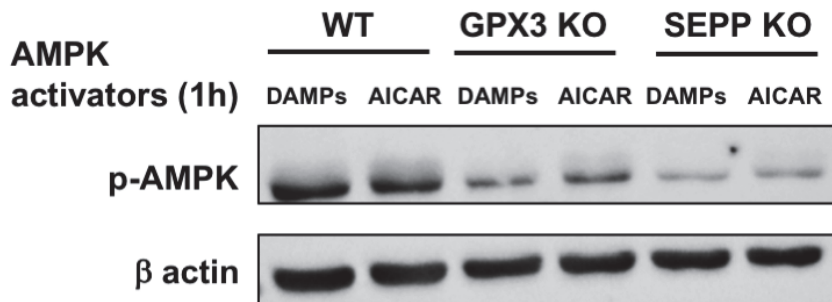


Figure 11 : La Sélénoprotéine P régule la GPX3 et l'activation de l'AMPK dans les macrophages. (A) Mécanisme de contrôle des phénotypes proposé : 1) La Sepp1 participe à la synthèse de GPX3, par sa fonction de transport du sélénium. La GPX3 empêche la production de ROS, ce qui dérégule l'activation de l'AMPK et par conséquent le phénotype des macrophages. 2) La Sepp1 empêche la production de ROS de façon directe, par sa fonction antioxydante, ce qui déclenche la dérégulation de l'activation de l'AMPK et par conséquent le phénotype des macrophages. (B) Niveau d'expression de l'ARN messager de GPX3 dans les macrophages M1 (induits avec IFN γ) WT, SEPP TRC ou SER MUT. (C) Expression de GPX3 dans les macrophages WT, SER MUT et SEPP TRC M1 (induit par IFN γ) ou M2 (induit par IL-10). (D) Phosphorylation de l'AMPK en présence de DAMPs ou d'AICAR pendant 1 heure.

Est-ce que la sélénoprotéine P inhibe l'expression du récepteur aux glucocorticoïdes pour contrôler les différents phénotypes des macrophages ?

Une autre perspective est d'étudier si la sélénoprotéine peut réguler l'expression de gènes qui induisent l'acquisition du profil pro ou anti-inflammatoire des macrophages. Il a été déjà démontré que le récepteur aux glucocorticoïdes (GR), un régulateur clé du profil anti-inflammatoire des macrophages, agit dans ces cellules en réprimant les gènes pro-inflammatoires comme iNOS pour l'acquisition d'un phénotype anti-inflammatoire (Glass and Ogawa, 2006). De plus, il a été démontré que le GR inhibe la transactivation du gène de la Sepp1 (Rock and Moos, 2009). Cependant, aucun travail n'a étudié la régulation potentielle de Sepp1 sur le GR. Ainsi, des expériences *in vitro* ont été réalisées afin d'identifier cette possible modulation. Nos résultats montrent que les macrophages SEPP KO anti-inflammatoires (induits par IL-10) expriment moins de GR par rapport au contrôle, ce qui pourrait confirmer l'hypothèse de la régulation du GR par Sepp1. (Figure 12)

Selenoproteins - Glucocorticoid receptor

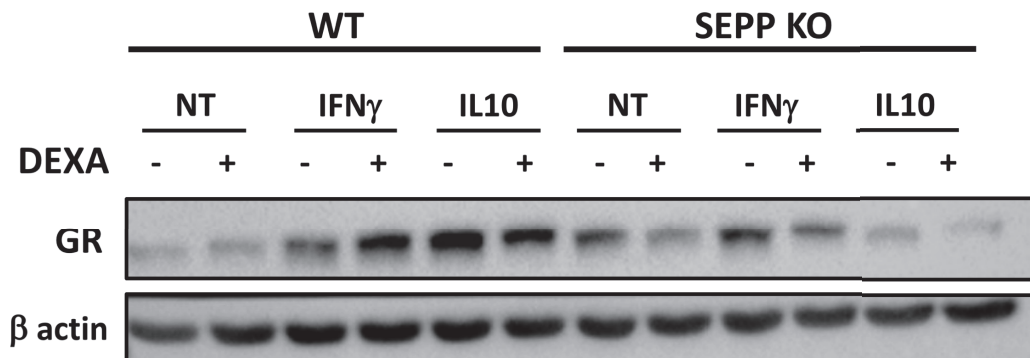


Figure 12 : Sélénoprotéine P régule le récepteur aux glucocorticoïdes et la répression des gènes pro-inflammatoires. (A) Expression du récepteur aux glucocorticoïdes (GR) dans les macrophages naïfs (NT), pro-inflammatoires (induit par IFN γ) ou anti-inflammatoires (induit par IL10), traités ou non traités avec de la dexaméthasone (DEXA).

Étude #2

Heparan sulfate mimetic accelerate post-injury skeletal muscle regeneration

Bouviere J*, Trignol A*, Hoang DH, Del Carmine P, Goriot ME, Ben Larbi S, Barritault D, Banzet S, Chazaud B

Au cours de ma thèse, j'ai participé à une étude sur le rôle d'autres molécules de l'environnement des cellules-souches musculaires, les glycosaminoglycanes. Une collaboration a été établie entre le laboratoire et la société OTR3, qui développe des glycosaminoglycanes mimétiques ou "agent de la régénération tissulaire" (RGTA®), qui sont bénéfiques dans divers modèles de réparation tissulaire, comme la peau. L'objectif de cette étude a été de déterminer si le traitement avec le RGTA® peut être bénéfique à la régénération musculaire, et si oui, sur quelles étapes de la myogenèse ou d'autres processus impliquant les cellules du microenvironnement. Ma contribution au projet a été : i) analyse des étapes de la myogenèse *in vitro* après le traitement avec le RGTA ; ii) analyse *in vivo* du rôle de RGTA sur l'homéostasie du muscle squelettique après une lésion ; iii) collaboration à l'écriture de l'article.

1. Composants de l'agent régénératif (RGTA) et leurs effets biologiques

La matrice extracellulaire (MEC) joue un rôle central dans l'intégrité et le remodelage des tissus. Le remodelage tissulaire est régulé par des signaux spécifiques (ou des peptides de communication tels que des facteurs de croissance) de l'espace extracellulaire autour des cellules. Ces signaux peuvent être déclenchés par une famille de polysaccharides appelée sulfates d'héparane, qui jouent un rôle essentiel dans la structure de la matrice extracellulaire en établissant un pont entre différentes protéines de la matrice, telles que le collagène et l'élastine (Witjas et al., 2018).

En cas de lésion tissulaire, des enzymes spécifiques appelées glycanases détruisent les sulfates d'héparane (HS), ce qui compromet l'activation des signaux spécifiques. Ensuite, d'autres enzymes appelées protéases altèrent également ces signaux ainsi que d'autres protéines structurelles de la matrice extracellulaire comme les glycosaminoglycannes (GAG) mimétiques. Par conséquent, de nombreuses études ont évalué le traitement de ces molécules synthétisées, qui constituent la matrice extracellulaire sur la modulation tissulaire.

Les GAG mimétiques composés de chaînes polysaccharidiques linéaires participent à de nombreux processus biologiques par l'interaction avec diverses biomolécules. Certains mimétiques naturels existent, tels que le chitosan et le fucoïdane. Cependant, l'utilisation de molécules synthétiques est préférable aux molécules naturelles car elles fournissent une constitution plus homogène ce qui réduit la variabilité biologique. Les principaux composants synthétiques sont des poly/oligosaccharides, des polypeptides et des polymères. Parmi ces éléments, l'agent régénératif (RGTA) est le plus connu actuellement et également utilisé dans notre étude. Le RGTA est composé d'un polymère de dextrane, abritant des groupes sulfatés et carboxyméthylés uniformes. Certaines formes de RGTA sont des molécules de qualité clinique générées selon les bonnes pratiques de fabrication (BPF) avec les deux molécules principales OTR-4120 et OTR-4131 contenant un groupe acétyle supplémentaire. Cela confère une plus grande affinité aux molécules de signalisation telles que FGF-2 et CXCL-12. Ils ont également des effets distincts sur différents types de cellules. Par exemple, OTR-4131 exerce une action plus efficace sur la prolifération des cellules progénitrices endothéliales et hématopoïétiques.

1.1 Les mécanismes d'action moléculaires du RGTA

Le RGTA agit comme un agent mimétique des HS, proches de l'héparine mais sans activité anticoagulante (sauf à des doses élevées). Les facteurs de croissance connus pour interagir avec les HS sont appelés facteurs de croissance de liaison à l'héparine (HBGF) et comprennent des molécules telles que les FGF, le VEGF, le CXCL-12 ou le TGF β . Par conséquent, les RGTA stabilisent et protègent certains de ces facteurs contre la dégradation enzymatique (Rouet et al., 2006). Le RGTA possède des propriétés mécaniques et sont résistants à la glycanase, tout en inhibant d'autres enzymes dégradant les composants de la matrice tels que l'élastase des neutrophiles, la plasmine ou l'héparanase (Rouet et al., 2005). De plus, le RGTA est bien toléré et peut être administré à la fois par des injections locales et systémiques.

1.2 Le RGTA et la réparation tissulaire

Le RGTA a démontré des propriétés de réparation prometteuses avec peu d'effets secondaires dans divers modèles de réparation tissulaire tels que la peau, les os, les tendons et la parodontite (Barbier-Chassefiere et al., 2009 ; Colombier et al., 1999, Jacquet-Guibon et al., 2018 ; Escartin et al., 2003). De plus, le RGTA est en cours d'évaluation pour des applications cliniques pour la cicatrisation des plaies et la réparation de la cornée *via* une administration locale. L'action du RGTA dépend de la dose. En effet, il a été supposé qu'un excès de RGTA déclenche une réponse exacerbée des récepteurs des facteurs de croissance lors de la fixation des facteurs de croissance. Le RGTA est ensuite éliminé dans la circulation sanguine, ce qui explique l'inefficacité des doses plus élevées. Le traitement avec RGTA induit une élévation de l'angiogenèse, probablement par un mécanisme d'interaction avec le VEGF. Cet effet récurrent est observé dans divers modèles de réparation tissulaire (Garcia-Filipe et al., 2007 ; Lafont et al., 2004).

1.3 RGTA dans la réparation du muscle squelettique

Dans la réparation du muscle squelettique, le rôle du RGTA n'a été exploré jusqu'à présent que dans la phase aiguë des modèles précliniques, ce qui rend difficile la distinction entre les effets sur les facteurs inflammatoires et les propriétés améliorant la régénération.

Dans les études utilisant des lésions d'écrasement et d'ischémie des membres postérieurs de rat, le RGTA a été toujours injecté immédiatement après la lésion. Dans ces études, l'action du RGTA s'est révélée indépendante de la manière dont il était administré (injection intramusculaire ou systémique). Après une seule administration du RGTA, les études ont observé une accélération de la régénération musculaire (Meddahi et al., 2002 ; Chevalier et al., 2015). La taille et le nombre de nouvelles myofibres ont augmenté et leur maturation était plus rapide. De plus, le RGTA a induit une diminution de la fibrose musculaire. Une seule étude a utilisé le RGTA de qualité clinique dans un modèle préclinique de lésion musculaire et a démontré un nombre plus élevé de noyaux dans les myofibres, suggérant une augmentation de la fusion des myofibres. Dans tous les modèles, une amélioration de l'angiogenèse a également été observée, de même qu'une augmentation locale des facteurs proangiogéniques (VEGF) dans les tissus (Chevalier et al., 2015).

Le RGTA agit également comme un inhibiteur enzymatique, avec une diminution observée de l'activité de la calpaïne pendant la régénération musculaire, confirmée dans les cultures de cellules progénitrices myogéniques (Zimowska et al., 2001). Des études *in vitro* utilisant des lignées de cellules myogéniques ou des cellules primaires de rats ont montré que les effets du RGTA étaient également liés à la dose, avec des concentrations efficaces favorisant à la fois la croissance cellulaire et la fusion (Barbosa et al., 2005 ; Zimowska et al., 2005). Ces effets sur la prolifération myogénique étaient principalement dus à la FGF-2, alors que son action biologique sur la fusion était associée à la mobilisation du calcium et à l'activité de la calpaïne. Ainsi, des recherches plus poussées sont nécessaires pour élucider la fenêtre de traitement et le mécanisme d'action du RGTA sur les différents types de cellules qui participent à la régénération musculaire.

1.4 Le facteur différentiel de notre étude

Dans cette étude, pour disséquer les effets du RGTA sur la régénération du muscle squelettique, nous avons utilisé le RGTA synthétique, (molécule appelée OTR4133) dans le modèle de lésion chimique induite par injection de la cardiotoxine, qui cible de façon homogène tout le muscle (au contraire des lésions mécaniques qui ciblent de manière hétérogène les différentes parties du muscle) et qui est hautement reproductible et bien établi sur les paramètres de cinétique des processus biologiques impliqués à la myogenèse, l'angiogenèse, l'inflammation et au remodelage de la matrice extracellulaire. La première phase est la phase inflammatoire pendant lequel les cellules inflammatoires envahissent le muscle endommagé, phagocytent les débris

tissulaires et stimulent l'expansion des cellules-souches musculaires (MuSCs). Au moment de la résolution de l'inflammation (jour 2-3), la phase de récupération commence, les MuSC quittent le cycle cellulaire, prolifèrent (jour 3 à 4 après la lésion) et s'engagent dans la différenciation myogénique terminale et fusionnent pour former de nouvelles myofibres (jours 6-14). Pendant la phase de récupération, nous observons la formation de nouveaux vaisseaux, car l'angiogenèse est couplée à la myogenèse (Latroche et al., 2017).

Dans la présente étude, nous avons identifié les effets d'une seule injection de RGTA pendant la phase de récupération, mentionné précédemment, et évalué les résultats concernant l'efficacité de la régénération. Les données ont montré que pendant la phase de récupération, l'administration du RGTA a stimulé la fusion des MuSCs, l'angiogenèse et la maturation des vaisseaux, accélèrent la régénération musculaire.

Heparan sulfate mimetics accelerate post-injury skeletal muscle regeneration

Jessica Bouvière^{1,5}, MSc; Aurélie Trignol^{1,2,5}, MD, PhD; Dieu-Huong Hoang¹, MSc; Peggy del Carmine¹, MSc; Marie-Emmanuelle Goriot², BSc; Sabrina Ben Larbi¹, BSc; Denis Barritault^{3,4}, PhD; Sébastien Banzet², MD, PhD; Bénédicte Chazaud^{1,5}, PhD.

1- Univ Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, CNRS UMR-5310, INSERM U-1217, Institut NeuroMyoGène, 8 Avenue Rockefeller, 69008, Lyon, France

2- Institut de Recherche Biomédicale des Armées, Département Soutien Médico-Chirurgical des Forces, UMR-MD-1197, 1 rue du lieutenant Raoul Batany, 92140, Clamart, France

3- OTR3, 4 rue Française, 75001, Paris, France

4- Laboratoire CRRET, Université Paris-Est Créteil, 94000 Créteil, France

5- Equally contributed to the work

6- Corresponding author

Jessica Bouvière	jessica.bouviere@univ-lyon1.fr	+33 426 688 249
Aurélie Trignol	aurelie.trignol@inserm.fr	+33 426 688 249
Dieu-Huong Hoang	dieu-huong.hoang@univ-lyon1.fr	+33 426 688 249
Peggy del Carmine	peggy.del-carmine@univ-lyon1.fr	+33 426 688 249
Marie-Emmanuelle Goriot	marie-emmanuelle.goriot@inserm.fr	+33 141 467 260
Sabrina Ben Larbi	sabrina.ben-larbi@univ-lyon1.fr	+33 426 688 249
Denis Barritault	denis.barritault@otr3.com	+33 664 100 550
Sébastien Banzet	sebastien.banzet@inserm.fr	+33 141 467 260
Bénédicte Chazaud	benedicte.chazaud@inserm.fr	+33 426 688 249

Abstract 100-200 words

Although skeletal muscle is capable of complete recovery after an injury, specific situations requires support or acceleration of this process, such as in elderly and athlete, respectively. Skeletal muscle regeneration is due to muscle stem cells that undergo adult myogenesis, a process sustained by muscle stem cell environment. Although recognized as important, extracellular matrix (ECM) has been overlooked in this process. Matrix-based therapy aims at improving ECM remodeling to support tissue repair. In this context, we investigated the properties of a single injection of the clinical grade glycosaminoglycan mimetics RGTA[®] (ReGeneraTing Agents) on skeletal muscle regeneration in a context compatible with a clinical application, *i.e.*, three days after the injury. Our results show that RGTA[®]-treated muscles showed an increase of the number of myonuclei in regenerating myofibers and an increase of the capillarization of the new myofibers. In vitro experiments showed that RGTA[®] directly acts on muscle stem cells by stimulating their fusion into myotubes and on endothelial cells by stimulating the formation and maturation of vessels in a 3D culture set up. These results indicate that a single administration of RGTA[®] in regenerating muscle stimulated both myogenesis and angiogenesis, thus accelerating skeletal muscle regeneration.

Impact statement

Although highly powerful in normal condition, post-injury skeletal muscle regeneration is less efficient in some situations, such as obese, elderly or resting people. In other context, such as high-performance sport, skeletal muscle regeneration must be shortened but in a way ensuring a full functional recovery. In this context, our results show that a single injection of the clinical grade glycosaminoglycan mimetics RGTA[®] (ReGeneraTing Agents) in a context compatible with a clinical application, *i.e.* three days after the injury is beneficial for skeletal muscle regeneration, through the stimulation of both myogenesis and angiogenesis.

Introduction

Adult skeletal muscle is highly adaptable to the physiological demand. Moreover, skeletal muscle is capable of complete recovery after an injury, thanks to the activation of muscle stem cells (MuSCs) that activate, expand, differentiate and finally fuse to form new functional myofibers (1). While historical investigations have focused on MuSCs, which are indispensable for muscle regeneration, more recent studies have evidenced that their environment is equally important for the efficacy of the regeneration process (2, 3). MuSC environment encompasses several cell types as well as the extracellular matrix (ECM) which has been overlooked in the regeneration process. Indeed, much attention has focused on the pathological development of excessive ECM, which is fibrosis (4), but the physiological roles of ECM remodeling remains poorly understood. The mechanisms by which ECM components support skeletal muscle regeneration are still largely unknown, due to technical limitations for the study of the large and insoluble ECM proteins and glycoproteins. Nevertheless, attempts have been made to manipulate skeletal muscle ECM in order to improve muscle repair, notably through the use of ECM scaffolds to restore volumetric muscle loss (5).

Matrix-based therapy aims at improving ECM remodeling to support tissue repair. In this context, components such as RGTA[®] for ReGeneraTing Agents include polymeric molecules that bind growth factors and cytokines and modulate their activity. Glycosaminoglycan mimetics mimic their capacities to sequester and present soluble factors to their receptors (6, 7). RGTA[®] are resistant to enzymatic degradation, and replace heparan sulfates (HS) at heparan-binding sites in the matrix, allowing the ECM scaffold and growth factors to reposition in the cellular microenvironment (7). Among the latest developed RGTA[®] are dextran polymers, harboring controlled sulfated or controlled sulfated carboxymethyl and acetylated groups and acting as an HS mimetic (7, 8), that has proven to improve repair of various tissues including skin (9), bone (10), tendon (11), or periodontal tissue (12), with no toxicity (13).

First developed RGTA[®] were tested in mechanical models of skeletal muscle injury, in healthy rats, where they were injected at the time of the damage. Results have shown an acceleration of the regeneration process assessed by the kinetics of myosin heavy chain

4

expression (14). Injection of RGTA[®] was also tested in the model of hindlimb critical ischemia that induces muscle injury, where it was also injected at the time of the damage. Results showed a protective effect of RGTA[®] on myofibers, and an improvement of the muscle repair process, mainly due to an increase of surviving myofibers (15). A clinical grade RGTA[®] was more recently used in the same context of hindlimb ischemia (16). It was shown that RGTA[®] increases the number of myonuclei, indicative of beneficial effect on myogenesis, as well as an increase of vessel density, indicative of a beneficial effect on angiogenesis (16). Here again, the administration was concomitant to the injury, preventing to discriminate the effects of RGTA[®] on cell survival *versus* on tissue repair. Moreover, administration of a therapeutic agent at the time of injury is not translatable to the clinical practice.

To dissect RGTA[®] effects on skeletal muscle regeneration, we used a defined RGTA[®] (namely OTR4133 with carboxymethyl sulfate and acetate groups) in a model of toxic injury that targets the whole muscle (on the contrary of mechanical injuries that differentially affects the various parts of the muscle) and which is highly reproducible and well-established in term of kinetics of the biological processes involved (*i.e.*, myogenesis, angiogenesis, inflammation, ECM remodeling). The first phase is the inflammatory phase during which inflammatory cells invade the damaged muscle, clean the tissue debris, and stimulate MuSC expansion (1-3). At the time of the resolution of inflammation (day 2-3), the recovery phase begins, MuSCs exit the cell cycle, proliferate (days 3-4 post-injury) and commit into terminal myogenic differentiation and fuse to form new myofibers (days 6-14) (17). During the recovery phase, the formation of new vessels is observed, since angiogenesis is coupled with myogenesis (18). In the present study, we identified the effects of a single injection of RGTA[®] at the time of recovery during skeletal muscle regeneration and evaluated the outcomes on regeneration efficiency. Data showed that during the recovery phase, RGTA[®] administration stimulated MuSC fusion and angiogenesis, accelerating muscle regeneration.

MATERIAL AND METHODS

Muscle injury. Adult 9-week-old C57BL/6J male mice were used according to the French legislation. Injury was induced by injecting 50 μ l of cardiotoxin (Latoxan, 12 μ M) in each Tibialis Anterior muscle as previously described (17). RGTA[®] (GAG mimetic ([OTR-4133], a close molecule to OTR4131 (11), provided by OTR3 Company, Paris, France), was injected into regenerating muscle 3 days after cardiotoxin injury at 1 μ g/10 μ l/muscle (control muscle was injected with 10 μ l of PBS /muscle). Mice were euthanized 8 and 28 days after injury and muscles were harvested, frozen in liquid nitrogen-precooled isopentane and stored at -80°C. Ten micrometer-thick cryosections were prepared for histological analysis.

Histological staining. Muscle sections were stained with Hematoxylin-Eosin to evaluate the overall regeneration process. Sudan black staining was made to stain lipids: sections were dehydrated in ethanol 70% for 10 sec, stained in Sudan Black solution (Sigma-Aldrich) for 2h, counterstained with Hemalun (Sigma-Aldrich) for 1 min and mounted with Fluoromount-G Mounting Medium (Interchim). The entire muscle section was scanned with an Axio Scan. Z1 microscope (Zeiss) at 20X objective connected to a 3 CCD HV-F 2025 color camera (Hitachi). Stained area was quantified using Image J software and was represented as a percentage of the entire muscle section area.

Histological immunolabeling. Muscle cryosections were treated with primary antibodies as in (18) for the detection of laminin (#L9393, Sigma-Aldrich) and of CD31 (Abcam, ab28364) revealed with Cy3- or FITC-conjugated antibodies (Jackson ImmunoResearch Inc). Nuclei were labeled with Hoechst (Sigma-Aldrich). For laminin immunolabeling, the entire cryosections were automatically scanned at X10 objective using an Axio Observer.Z1 (Zeiss) connected to a CoolSNAP HQ2 CCD Camera (photometrics). The image of the whole cryosection was automatically reconstituted in MetaMorph Software. Cross Sectional Area (CSA) was measured using a macro developed under ImageJ software (19). For CD31 evaluation, about 10-12 pictures were recorded at 20x objective. The number of vessels (CD31 positive structures exhibiting a nucleus) and the number of myofibers were counted.

Muscle stem cell culture. MuSCs were extracted from mouse muscle hindlimbs from 3 to 5 weeks of age as described previously (17). Cells were cultured on 2-well permanox

6

chambers (Nunc Lab-Tek) coated with Matrigel Matrix Growth Factor Reduced (Corning, 356231) (1/10). For proliferation assay, MuSCs were seeded at 10000 cell/cm² in proliferation medium [DMEM/F12 (Gibco), 20% Fetal Bovine Serum (Gibco) and 2% Ultrosert™ G (Pall Inc)] for 6 h, washed 3 times with PBS and were incubated in proliferation medium containing or not RGTA[®] (10 µg/ml) for 1 day at 37°C. Immunolabeling for Ki67 (Abcam, ab15580) was performed as described in (17). For fusion assay, MuSCs were seeded at 30000 cell/cm² in proliferating medium for 6 h then they were switched to differentiation medium [DMEM/F12, 2% horse serum (Gibco)] containing or not RGTA[®] (10 µg/ml) for 3 days at 37°C. Phalloidin staining (Sigma-Aldrich, P5282) was used to label actin and Hoechst to stain nuclei. Pictures were recorded using a Zeiss Observer Z1 microscope connected to a Coolsnap HQ (Photometrics) camera at 20x magnification. About 6-8 randomly chosen fields were counted. The number of ki67positive cells was expressed as a percentage of total nuclei. The number of nuclei per cell was counted, defining several classes of myotubes. Fusion index was calculated as the number of nuclei within myotubes upon the total number of nuclei.

3D angiogenesis culture assay. 3D culture was carried out as previously described (18). Briefly, HUVECs were infected with lenti-GFP, were seeded on cytodex beads and embedded into a fibrinogen solution. The cells/fibrinogen solution was allowed to clot and form a gel in 8-well glass Lab-Tek. When set, EndoGro medium containing or not RGTA[®] (10 µg/ml) was added on top of the gel and was changed every 2 days. After 6 days, cultures were captured using a Zeiss Observer Z1 microscope connected to a Coolsnap HQ (Photometrics) camera at 10x objective. Analysis was done with ImageJ software as described in (18).

Statistical analysis. Results are expressed as means ± SEM. Statistical analyses t-tests and ANOVA as described in the figure legends. The number of experiments is indicated in the figure legends.

Results and Discussion

RGTA[®] was *in situ* administrated 3 days post-injury. In this way, the effects of RGTA[®] were analyzed on the recovery phase of muscle regeneration, that takes place after the inflammatory phase is resolved (20). Days 8 and 28 post injury were chosen to evaluate the direct impact and the long-lasting effects of RGTA[®] on muscle regeneration, respectively. RGTA[®] show a dose-dependent effect on tissue repair with a bell-shaped curve (7). Pharmacokinetic studies showed a durable accumulation (8 days) of RGTA[®] at sites of injury/regeneration when administrated once at the time of the injury, either locally or systemically (21), suggesting that a single injection could be optimal. The dose chosen was adapted from previous studies and results from OTR3 (16).

RGTA[®] is beneficial to skeletal muscle regeneration by increasing muscle cell fusion and angiogenesis

Cardiotoxin-injected Tibialis Anterior muscles presented a homogenous regeneration pattern indicating that the puncture made at day 3 post-injury (of either saline or RGTA[®]) did not induce a supplementary locally lasting injury (Figure 1A). At day 8 after injury, there was no difference in weight between the RGTA[®]-treated and control muscles (Figure 2A). Laminin immunostaining, to label the basal membrane surrounding each myofiber, was made to analyze the number and size of myofibers (Figure 1B). The total number of myofibers was not changed (Figure 2A), neither the size of the myofibers (Figure 2C,D). However, our analysis showed that RGTA[®] treatment induced an important increase of the number of myonuclei per myofiber (+145%) (Figure 2E) that led to the increased number of myofibers presenting 4 or more nuclei on the muscle sections (Figure 2F). This result suggests that RGTA[®] treatment increased myogenic cell fusion at the time of the formation of new myofibers during muscle regeneration. Sudan Black staining indicated that the area covered by lipids decreased by 60% in RGTA[®]-treated muscles (Figure 1C, Figure 2G). Lipid accumulation in regenerating muscle is a hallmark of defective regeneration, adipocytes deriving from Fibro-Adipogenic Precursors (FAPs) (22). However, the level of lipid staining was very low even in the control muscles (0.3% of the total muscle area) suggesting no major change in FAP homeostasis. Finally, immunostaining for CD31 (expressed by endothelial cells) was performed to analyze the capillarization of

8

myofibers. The number of capillaries/myofiber was increased by 134% in RGTA[®]-treated muscles as compared with the control muscles (Figure 1D, Figure 2H), indicating that RGTA[®] increased angiogenesis during muscle regeneration.

Similar analyses were performed at day 28 after the injury to evaluate the long-lasting effects of RGTA[®]-treatment (Figure 3). Muscle weight (Figure 4A), myofiber number (Figure 4B) and size of the myofibers (Figure 4C,D) were not changed by RGTA[®] treatment. The mean number of nuclei in myofibers was normalized between the two conditions (Figure 4E) while the distribution of the myofibers according to their number of myonuclei was still statistically different, indicating that myofibers with high numbers of nuclei were more numerous in RGTA[®]-treated muscles than in control muscles (Figure 4F). Adiposis staining was very low at day 28 post-injury with no difference between control and RGTA[®]-treated groups (Figures 3C, 4G). On the contrary, capillarization of the myofibers was still 123% higher in RGTA[®]-treated muscles than in control muscles (Figures 3D, 4H).

Altogether, these results indicate that RGTA[®] administration at the time of the resolution of inflammation supported the recovery processes and accelerated muscle regeneration. A previous study reported an increased size of generating myofibers upon RGTA[®] treatment, the mimetic was administrated at the time of the injury (which was ischemia/denervation) and the treatment was associated with a decrease of cell damage (15). In a similar critical hindlimb ischemia, where the first damage is vascular, RGTA[®] administration at the time of injury increased the density of myonuclei and that of vessels 8 days after ischemia (16). Our *in vivo* results indicate a long-lasting effect of RGTA[®] on muscle cell fusion and on angiogenesis during muscle regeneration.

RGTA[®] directly acts on muscle stem cells and endothelial cells to stimulate myogenesis and angiogenesis *in vitro*

Upon activation after muscle injury (*i.e.*, plating in culture), MuSCs first proliferate to expand, then exit the cell cycle to commit into terminal differentiation to fuse together to form multinucleated myotubes, which prefigure the myofibers *in vitro*. MuSC proliferation and differentiation/fusion are regulated by opposite molecular mechanisms (1). To confirm the above *in vivo* observations at the cell level *in vitro*, culture experiments were performed in the presence of RGTA[®]. *In vitro* and *in vivo* comparisons are difficult to make

since the accessibility of the cells to the compound *in vivo* is difficult to assess. We therefore tested a range of RGTA[®] concentrations to investigate its effect on MuSC fusion, since the major outcome observed *in vivo* was an increase of the number of myonuclei per myofiber. Myotubes were identified as structures containing several nuclei after staining for the ubiquitous cytoskeletal component actin (Figure 5A,B). Our results show that a concentration of 10 µg/ml of RGTA[®] produced the most consistent effect on several primary cells (data not shown) and was chosen. In accordance with the increased number of myonuclei in regenerating myofibers in RGTA[®]-treated muscles *in vivo*, RGTA[®] stimulated MuSC fusion (+145%), dramatically increasing the appearance of myotubes exhibiting high number of nuclei (Figure 5A,B). Consistently, RGTA[®] induced a decrease of the proliferation of MuSCs (-19%) (Figure 5C,D) that was evaluated after immunostaining for ki67 that labels cycling cells. These results show that RGTA[®] directly promotes MuSC fusion, in accordance with the *in vivo* results. Previous studies, using either cell lines or rat primary cells, showed that the effects of RGTA[®] are dose-dependent, and for the efficient concentrations, promotes both cell growth and fusion that were analyzed in the same experiment (23-25). RGTA[®] proliferative effect was mainly driven through its potentiating effect of FGFb on MuSCs (24). Similarly, RGTA[®] was shown to increase angiogenesis through the potentiation of VEGF properties (26). We took advantage of a 3D angiogenesis model in which GFP-labelled human endothelial cells are allowed to form new vessels that further lumenize, indicative of their differentiation and the maturation of the newly formed capillaries (18). Using this device, we showed that RGTA[®] increased (+168%) the length of capillaries that formed (Figure 4E,F). Moreover, RGTA[®] triggered the maturation of the sprouting vessels, as assessed by a huge increase of their lumenization (+248%) (Figure 5G). It is to note that in the RGTA[®] condition, more nuclei are visible within the gel (Figure 5F), indicative of a stimulating effect of RGTA[®] on endothelial cell proliferation, which was previously reported (26, 27). These results show the direct proangiogenic properties of RGTA[®] on endothelial cells, in accordance of the increased capillarization observed in the regenerating muscle *in vivo* upon RGTA[®] treatment.

In conclusion, our study shows that the clinical-grade RGTA[®] is effective at accelerating muscle regeneration when locally administered at the onset of the regenerating phase, a

10

clinically compatible time-point. We showed *in vitro* that the main properties of RGTA[®] are a stimulating effect on MuSC fusion that is required for the formation of new myofibers and on the formation and maturation of new blood vessels. These direct and specific effects of RGTA[®] on MuSCs and endothelial cells accelerate myogenesis and angiogenesis during muscle regeneration. As a natural HS, RGTA[®] hold a strong binding capacity for soluble factors providing their stability and their protection against enzymatic degradation (8). Growth factors known to interact with HS include molecules such as FGF, VEGF or TGF β , which have been involved in both myogenesis and angiogenesis (1). Thus RGTA[®] compounds may be of interest for accelerating muscle regeneration or healing in specific conditions, for example in athletes, for which this process needs to be shorten.

Acknowledgements

This work was supported by ANR-15-ASTR-0013-01 Myo-MECa, supported by Agence National de la Recherche and Direction Générale des Armées.

Author Disclosure Statement

No competing financial interests exist.”

Reprint author

Institut NeuroMyoGène
 UMR CNRS 5310 – INSERM U1217
 Université Claude Bernard Lyon 1
 8 Avenue Rockefeller
 F-69008 Lyon
 Tel: (33) 4 26 68 82 49
 benedicte.chazaud@inserm.fr

References

1. Yin, H., Price, F., and Rudnicki, M.A. Satellite cells and the muscle stem cell niche. *Physiol Rev.* 93, 23-67, 2013.
2. Dumont, N.A., Wang, Y.X., and Rudnicki, M.A. Intrinsic and extrinsic mechanisms regulating satellite cell function. *Development.* 142, 1572-81, 2015.
3. Wosczyzna, M.N., and Rando, T.A. A Muscle Stem Cell Support Group: Coordinated Cellular Responses in Muscle Regeneration. *Dev Cell.* 46, 135-143, 2018.
4. Chapman, M.A., Meza, R., and Lieber, R.L. Skeletal muscle fibroblasts in health and disease. *Differentiation.* 92, 108-115, 2016.
5. Badylak, S.F., Dziki, J.L., Sicari, B.M., Ambrosio, F., and Boninger, M.L. Mechanisms by which acellular biologic scaffolds promote functional skeletal muscle restoration. *Biomaterials.* 103, 128-136, 2016.
6. Barbier-Chassefiere, V., Garcia-Filipe, S., Yue, X.L., Kerros, M.E., Petit, E., Kern, P., et al. Matrix therapy in regenerative medicine, a new approach to chronic wound healing. *J Biomed Mater Res A.* 90, 641-7, 2009.
7. Barritault, D., Desgranges, P., Meddahi-Pelle, A., Denoix, J.M., and Saffar, J.L. RGTA((R))-based matrix therapy - A new branch of regenerative medicine in locomotion. *Joint Bone Spine.* 84, 283-292, 2017.
8. Rouet, V., Meddahi-Pelle, A., Miao, H.Q., Vlodavsky, I., Caruelle, J.P., and Barritault, D. Heparin-like synthetic polymers, named RGTAs, mimic biological effects of heparin in vitro. *J Biomed Mater Res A.* 78, 792-7, 2006.
9. Garcia-Filipe, S., Barbier-Chassefiere, V., Alexakis, C., Huet, E., Ledoux, D., Kerros, M.E., et al. RGTA OTR4120, a heparan sulfate mimetic, is a possible long-term active agent to heal burned skin. *J Biomed Mater Res A.* 80, 75-84, 2007.

12

10. Frescaline, G., Boudierlique, T., Mansoor, L., Carpentier, G., Baroukh, B., Sineriz, F., et al. Glycosaminoglycan mimetic associated to human mesenchymal stem cell-based scaffolds inhibit ectopic bone formation, but induce angiogenesis in vivo. *Tissue Eng Part A*. 19, 1641-53, 2013.
11. Jacquet-Guibon, S., Dupays, A.G., Coudry, V., Crevier-Denoix, N., Leroy, S., Sineriz, F., et al. Randomized controlled trial demonstrates the benefit of RGTA(R) based matrix therapy to treat tendinopathies in racing horses. *PLoS One*. 13, e0191796, 2018.
12. Lallam-Laroye, C., Baroukh, B., Doucet, P., Barritault, D., Saffar, J.L., and Colombier, M.L. ReGeneraTing agents matrix therapy regenerates a functional root attachment in hamsters with periodontitis. *Tissue Eng Part A*. 17, 2359-67, 2011.
13. Charef, S., Tulliez, M., Esmilaire, L., Courty, J., and Papy-Garcia, D. Toxicological evaluation of RGTA OTR4120, a heparan sulfate mimetic. *Food Chem Toxicol*. 48, 1965-8, 2010.
14. Aamiri, A., Butler-Browne, G.S., Martelly, I., Barritault, D., and Gautron, J. Influence of a dextran derivative on myosin heavy chain expression during rat skeletal muscle regeneration. *Neurosci Lett*. 201, 243-6, 1995.
15. Desgranges, P., Barbaud, C., Caruelle, J.P., Barritault, D., and Gautron, J. A substituted dextran enhances muscle fiber survival and regeneration in ischemic and denervated rat EDL muscle. *Faseb J*. 13, 761-6, 1999.
16. Chevalier, F., Arnaud, D., Henault, E., Guillevic, O., Sineriz, F., Ponsen, A.C., et al. A fine structural modification of glycosaminoglycans is correlated with the progression of muscle regeneration after ischaemia: towards a matrix-based therapy? *Eur Cell Mater*. 30, 51-68, 2015.
17. Theret, M., Gsaier, L., Schaffer, B., Juban, G., Ben Larbi, S., Weiss-Gayet, M., et al. AMPKalpha1-LDH pathway regulates muscle stem cell self-renewal by controlling metabolic homeostasis. *Embo J*. 36, 1946-1962, 2017.

18. Latroche, C., Weiss-Gayet, M., Muller, L., Gitiaux, C., Leblanc, P., Liot, S., et al. Coupling between Myogenesis and Angiogenesis during Skeletal Muscle Regeneration Is Stimulated by Restorative Macrophages. *Stem Cell Rep.* 9, 2018-2033, 2017.
19. Desgeorges, T., Liot, S., Lyon, S., Bouviere, J., Kemmel, A., Trignol, A., et al. Open-CSAM, a new tool for semi-automated analysis of myofiber cross-sectional area in regenerating adult skeletal muscle. *Skelet Muscle.* 9, 2, 2019.
20. Chazaud, B. Macrophages: supportive cells for tissue repair and regeneration. *Immunobiology.* 219, 172-178, 2014.
21. Meddahi, A., Bree, F., Papy-Garcia, D., Gautron, J., Barritault, D., and Caruelle, J.P. Pharmacological studies of RGTA(11), a heparan sulfate mimetic polymer, efficient on muscle regeneration. *J Biomed Mater Res.* 62, 525-31, 2002.
22. Natarajan, A., Lemos, D.R., and Rossi, F.M. Fibro/adipogenic progenitors: A double-edged sword in skeletal muscle regeneration. *Cell Cycle.* 9, 2045-2046, 2010.
23. Barbosa, I., Morin, C., Garcia, S., Duchesnay, A., Oudghir, M., Jenniskens, G., et al. A synthetic glycosaminoglycan mimetic (RGTA) modifies natural glycosaminoglycan species during myogenesis. *J Cell Sci.* 118, 253-64, 2005.
24. Papy-Garcia, D., Barbosa, I., Duchesnay, A., Saadi, S., Caruelle, J.P., Barritault, D., et al. Glycosaminoglycan mimetics (RGTA) modulate adult skeletal muscle satellite cell proliferation in vitro. *J Biomed Mater Res.* 62, 46-55, 2002.
25. Zimowska, M., Constantin, B., Papy-Garcia, D., Raymond, G., Cognard, C., Caruelle, J.P., et al. Novel glycosaminoglycan mimetic (RGTA, RGD120) contributes to enhance skeletal muscle satellite cell fusion by increasing intracellular Ca²⁺ and calpain activity. *J Cell Physiol.* 205, 237-45, 2005.

26. Rouet, V., Hamma-Kourbali, Y., Petit, E., Panagopoulou, P., Katsoris, P., Barritault, D., et al. A synthetic glycosaminoglycan mimetic binds vascular endothelial growth factor and modulates angiogenesis. *J Biol Chem.* 280, 32792-800, 2005.
27. Chevalier, F., Lavergne, M., Negroni, E., Ferratge, S., Carpentier, G., Gilbert-Sirieix, M., et al. Glycosaminoglycan mimetic improves enrichment and cell functions of human endothelial progenitor cell colonies. *Stem Cell Res.* 12, 703-15, 2014.

Bouviere, Trignol et al., Figure legends TEA-2019-0058 R1

Figure legends

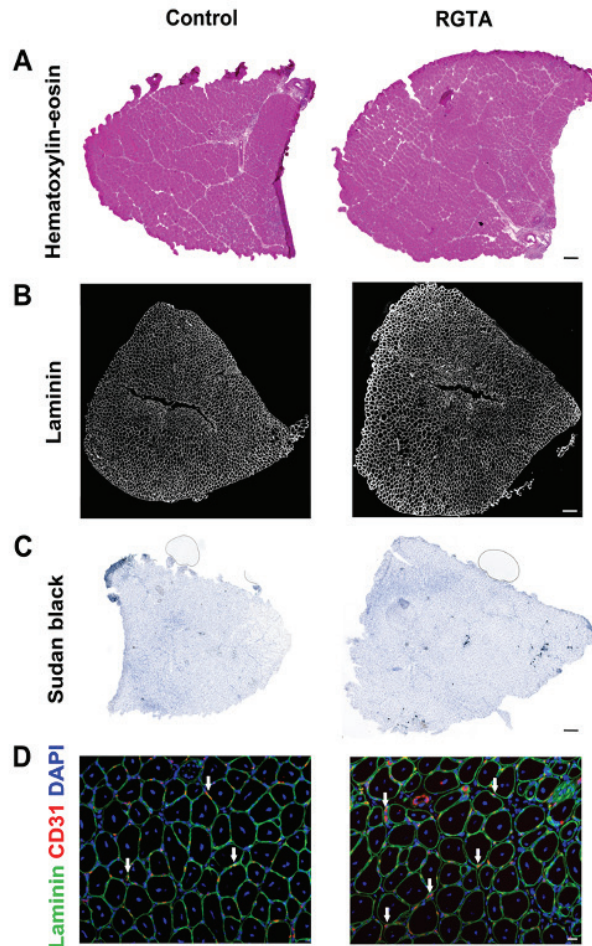


Figure 1 – Analysis of the effects of RGTA[®] on skeletal muscle regeneration 8 days post injury. RGTA[®] (1 µg/muscle) was *i.m.* injected 3 days after cardiotoxin injury and muscles were recovered 5 days later. **(A)** Hematoxylin-eosin staining indicating that the whole muscle underwent regeneration. **(B)** Muscle sections were immunolabeled for the detection of laminin (component of the basal lamina) to identify individual myofibers in the regenerating muscle. **(C)** Black Sudan staining was performed to detect adiposis. **(D)** Muscle sections were immunolabeled for the detection of CD31 (vessels, red), laminin (basal lamina, green), and Hoechst (nuclei, blue). White arrows show the capillaries (red). Bar=250µm in A-C. Bar=25µm in D.

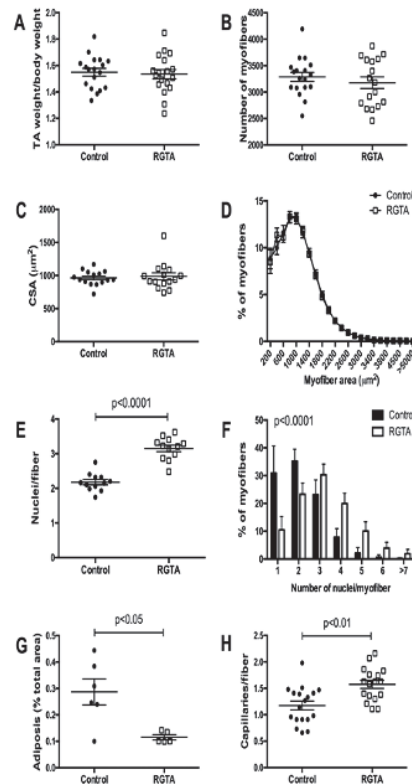


Figure 2 – Effect of RGTA[®] on skeletal muscle regeneration 8 days post-injury. RGTA[®] (1 µg/muscle) was *i.m.* injected 3 days after cardiotoxin injury and muscles were recovered 5 days later. **(A)** Muscle weight (mg) of the *Tibialis Anterior* muscle was normalized to the body weight (g). **(B-D)** Muscle sections were immunolabeled for the detection of laminin (as in Figure 1B) and the total number of myofibers (B), the mean Cross Section Area (CSA) (C) and the CSA distribution (D) were calculated using Open-CSAM macro in ImageJ software. **(E-F)** The number of nuclei/myofiber was calculated and given as the mean of the number of nuclei/fiber (E) and as the distribution of myofibers according to the number of nuclei they contain (F). **(G)** Stained area after Black Sudan staining (as in Figure 1C) was reported in % of the total muscle area. **(H)** Muscle sections were immunolabeled for the detection of laminin and of CD31 (as in Figure 1D). The number of CD31^{POS} structures per myofiber was calculated. 3 independent series of experiments including each 3 control (saline injected) and 3 RGTA[®]-treated mice were performed. Data are given as means ± SEM. T-test was performed except in D and F where 2-way ANOVA was used.

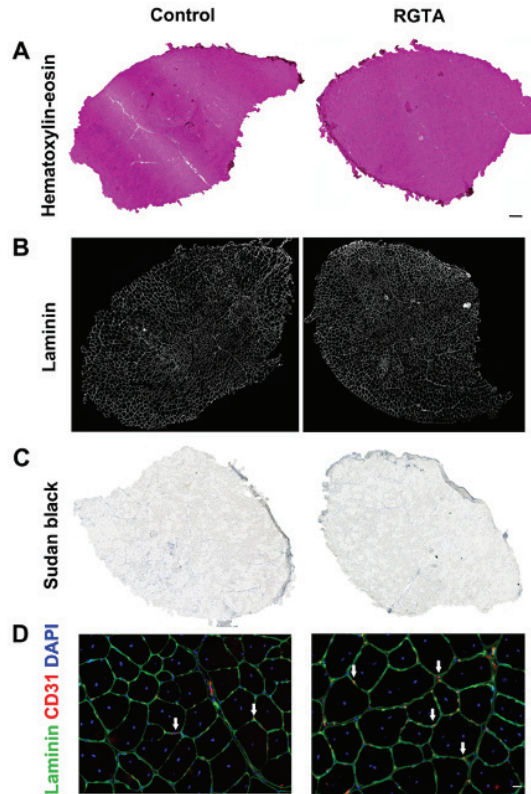


Figure 3 – Analysis of the effects of RGTA[®] on skeletal muscle regeneration 28 days post injury. RGTA[®] (1 µg/muscle) was *i.m.* injected 3 days after cardiotoxin injury and muscles were recovered 25 days later. **(A)** Hematoxylin-eosin staining. **(B)** Muscle sections were immunolabeled for the detection of laminin (basal lamina) to identify individual myofibers. **(C)** Black Sudan staining was performed to detect adiposis. **(D)** Muscle sections were immunolabeled for the detection of CD31 (vessels, red), laminin (basal lamina, green), and Hoechst (nuclei, blue). White arrows show the capillaries (red). Bar=250µm in A-C. Bar=25µm in D.

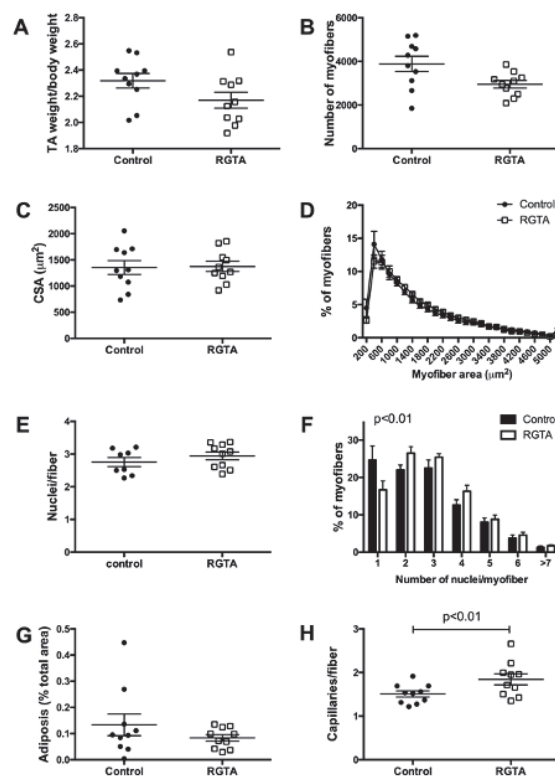


Figure 4 – Effect of RGTA[®] on skeletal muscle regeneration 28 days post injury. RGTA[®] (1 µg/muscle) was *i.m.* injected 3 days after cardiotoxin injury and muscles were recovered 25 days later. **(A)** Muscle weight (mg) of the *Tibialis Anterior* muscle was normalized to the body weight (g). **(B-D)** Muscle sections were immunolabeled for the detection of laminin and the total number of myofibers (B), the mean Cross Section Area (CSA) (C) and the CSA distribution (D) were calculated using Open-CSAM macro in ImageJ software. **(E-F)** The number of nuclei/myofiber was calculated and given as the mean of number of nuclei/fiber (E) and as the distribution of myofibers according to the number of nuclei they contain (F). **(G)** Stained area after Black Sudan staining was reported in % of the total muscle area. **(H)** Muscle sections were immunolabeled for the detection of laminin and of CD31. The number of CD31^{POS} structures per myofiber was calculated. Two independent series of experiments including each 3 and 5 control (saline injected) and 3 and 5 RGTA[®]-treated mice were performed. Data are given as means ± SEM. T-test was performed except in D and F where 2-way ANOVA was used.

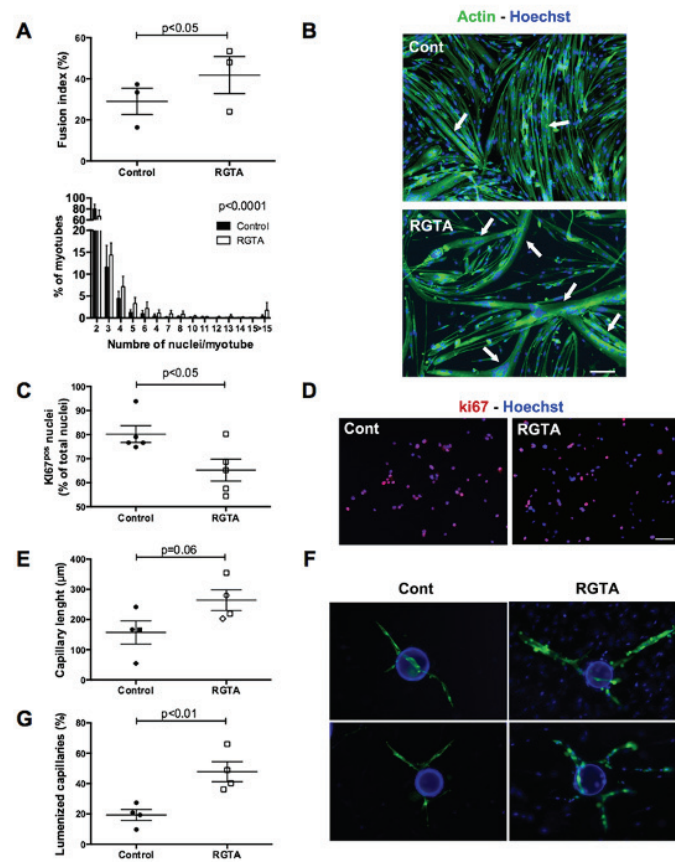


Figure 5 – Effect of RGTA[®] on *in vitro* myogenesis and angiogenesis. (A-B) RGTA[®] (10 µg/ml) was added to MuSC cultures at the time of differentiation and MuSC fusion was assessed 3 days later after actin staining with phalloidin (green) and was expressed as the fusion index and as the distribution of myotubes according to the number of nuclei they contain. White arrows in B show multinucleated myotubes. (C-D) RGTA[®] (10 µg/ml) was added to MuSC cultures during proliferation and ki67 immunolabeling (red) was performed one day later. The number of cycling (ki67^{pos}) cells was expressed in % of total cells. (E-G) RGTA[®] (10 µg/ml) was added to GFP-expressing endothelial cell 3D cultures and angiogenesis was assessed 6 days later. Endothelial cell (green) sprouting (capillary length, E) and differentiation (lumenized capillaries, G) were evaluated. Blue=Hoechst. Bar=100 µm. Independent experiments performed on different primary MuSC cultures were performed (n=5 in A, n=3 in C, n=4 in E). Data are given as means ± SEM. T-test was performed except in lower panel A where 2-way ANOVA was used.

Étude #3

Open-CSAM, a new tool for semi-automated analysis of myofiber cross-sectional area in regenerating adult skeletal muscle

Desgeorges T, Liot S, Lyon S, **Bouviere J**, Kemmel A, Trignol A, Rousseau D, Chapuis B, Gondin J, Mounier R, Chazaud B[#] and Juban G[#]

Afin d'analyser l'efficacité de la régénération musculaire, la taille de la myofibre est le principal paramètre étudié. Cela est dû au fait que la taille de la myofibre est corrélée à la force musculaire. De cette manière, la mesure de la surface de la section transversale de la myofibre est cruciale pour comprendre la régénération musculaire dans mon projet de doctorat. Les analyses se faisaient généralement manuellement. Ainsi, j'ai participé comme collaboratrice au développement d'un programme utilisant le logiciel ImageJ pour quantifier semi automatiquement la taille des myofibres afin d'optimiser le temps de travail. La nouvelle macro ImageJ, publié dans le journal *Skeletal Muscle*, a permis d'analyser les données *in vivo* des études #1 et #2 de mon projet de thèse.

METHODOLOGY

Open Access



Open-CSAM, a new tool for semi-automated analysis of myofiber cross-sectional area in regenerating adult skeletal muscle

Thibaut Desgeorges¹, Sophie Liot¹, Solene Lyon², Jessica Bouvière¹, Alix Kemmel¹, Aurélie Trignon¹, David Rousseau², Bruno Chapuis³, Julien Gondin¹, Rémi Mounier¹, Bénédicte Chazaud^{1*}  and Gaëtan Juban^{1*}

Abstract

Adult skeletal muscle is capable of complete regeneration after an acute injury. The main parameter studied to assess muscle regeneration efficacy is the cross-sectional area (CSA) of the myofibers as myofiber size correlates with muscle force. CSA analysis can be time-consuming and may trigger variability in the results when performed manually. This is why programs were developed to completely automate the analysis of the CSA, such as SMASH, MyoVision, or MuscleJ softwares. Although these softwares are efficient to measure CSA on normal or hypertrophic/atrophic muscle, they fail to efficiently measure CSA on regenerating muscles. We developed Open-CSAM, an ImageJ macro, to perform a high throughput semi-automated analysis of CSA on skeletal muscle from various experimental conditions. The macro allows the experimenter to adjust the analysis and correct the mistakes done by the automation, which is not possible with fully automated programs. We showed that Open-CSAM was more accurate to measure CSA in regenerating and dystrophic muscles as compared with SMASH, MyoVision, and MuscleJ softwares and that the inter-experimenter variability was negligible. We also showed that, to obtain a representative CSA measurement, it was necessary to analyze the whole muscle section and not randomly selected pictures, a process that was easily and accurately performed using Open-CSAM. To conclude, we show here an easy and experimenter-controlled tool to measure CSA in muscles from any experimental condition, including regenerating muscle.

Background

Skeletal muscle is capable of complete regeneration after an acute injury [1]. Skeletal muscle integrity is usually assessed by histological analyses, consisting of staining and/or immunofluorescent labeling of various cellular or molecular structural components of the tissue. Among these analyses, myofiber cross-sectional area (CSA) is widely used because it reflects the regenerative capacity of the muscle, i.e., the formation of new myofibers from the activation, proliferation, differentiation, and fusion of muscle stem cells [1]. CSA measurement is usually performed after immunofluorescent staining of laminin, a

component of the basal lamina surrounding each myofiber, or of dystrophin that is located at the inside face of the sarcolemma.

Analysis methods range from manual quantification to programs showing various levels of automation. Manual quantification is potentially the most accurate method as the experimenter keeps total control over the myofibers being analyzed. However, the manual procedure is highly time-consuming and may present variability between experimenters. This is why automated programs were developed to limit the experimenter input and save time [2–7]. For example, SMASH [7] is a semi-automated open source MATLAB script allowing the assessment of several parameters, including CSA. MyoVision, a Windows program [2], was developed to fully automate the quantification process. This program combines several

* Correspondence: benedicte.chazaud@inserm.fr; gaetan.juban@univ-lyon1.fr
¹Institut NeuroMyoGène, Univ Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, CNRS UMR 5310, INSERM U1217, 8 Avenue Rockefeller, F-69008 Lyon, France
Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s). 2019 **Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

algorithms that were previously used separately in other programs, thus reducing the errors in the fiber identification and leading to a more accurate CSA measurement compared to SMASH on uninjured muscle [2]. Recently, MuscleJ, a fully automated plug-in in ImageJ described the fully automated quantification of various skeletal muscle parameters, including CSA [8].

Most of the automated softwares were tested on normal muscle or under conditions triggering atrophy/hypertrophy. In this context, the shape of the myofibers keeps polygonal and angular, myofibers keeping their contact with each other. On the contrary, regenerating muscle is characterized by the presence of round-shaped regenerating myofibers of highly variable size that, for the smallest ones, do not regularly contact surrounding fibers. Thus, variable myofiber shape, size, and extrafiber space characterize the regenerating muscle, rendering the automated quantification more difficult.

Here, we present a semi-automated CSA quantification method for skeletal muscle images applicable on any type of muscle and under any condition, including early and late regenerating muscle and dystrophic muscle. This method, named Open-CSAM (for Open [free]-Cross Sectional Area Measurement), is based on an ImageJ macro designed to automatically quantify CSA on immunofluorescent picture of the whole skeletal muscle section. It also includes some level of flexibility for the experimenter, allowing manual correction of the mistakes made by the automation. Moreover, it allows the analysis of the size of the myofibers on the whole muscle section, which we show here to be necessary to obtain an accurate measurement.

Methods

Animals and tissue preparation

C57BL/6 and mdx mice were used according to the French legislation. All experiments were performed on mice between 8- and 12-week-old, except for old mice, which were 2-year-old. In injury experiments, *Tibialis Anterior* (TA) muscles were injected with 50 μ l of cardiotoxin (Latoxan) at 12 μ M as previously described [9]. Fibrotic dystrophic mice (Fib-mdx) were generated as previously described [10] and mice were analyzed 1 week after the last injuries. TA muscles were mounted on pieces of cork and fixed with tragacanth gum. Then, they were frozen in isopentane cooled by liquid nitrogen and further stored at -80°C . TA muscles were sectioned thanks to a cryomicrotome (CM3050s, Leica), and the thickness of cryosection was 8 to 10 μ m. The slides were then stored at -80°C until immunostaining. TA muscles showing more than 15% of uninjured area (i.e., without centrally located nuclei), indicating that CTX did not spread into the entire muscle, were excluded from the study.

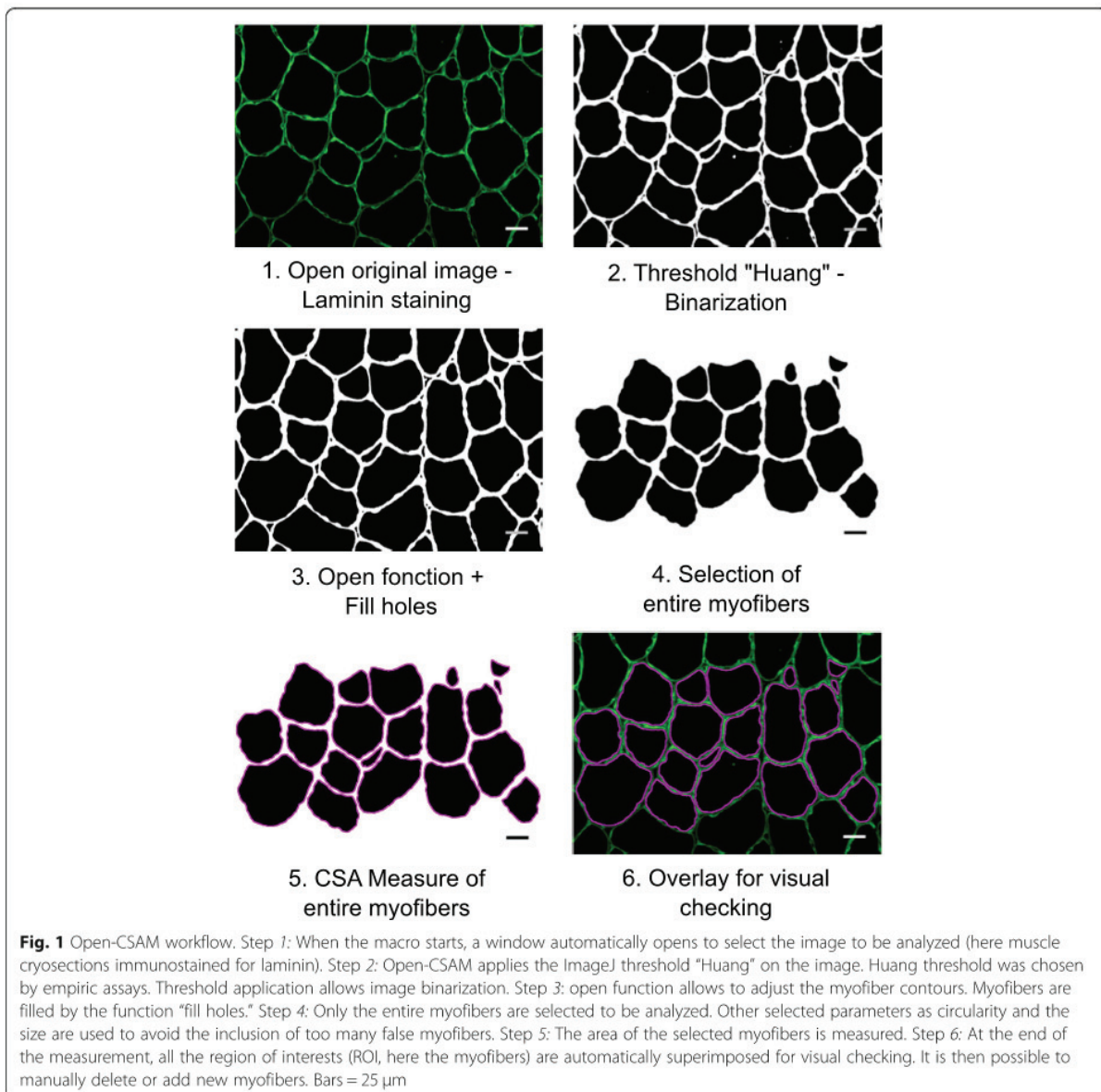
Immunofluorescence

Slides were dried for 10 min at room temperature. Muscle cryosections were encircled with a hydrophobic pen (Dako) and were incubated with PBS containing Triton 0.5% for 10 min and then washed three times with PBS. They were incubated with BSA 2% for 1 h at room temperature and then incubated overnight with a rabbit anti-laminin antibody (1:200, L9393, Sigma-Aldrich) at 4°C in a moist chamber. Slides were washed three times with PBS and incubated with FITC-conjugated donkey anti-rabbit secondary antibody (1:200; 711-095-152, Jackson Laboratories) at 37°C for 45 min. Sections were soaked for 10 s in Hoechst solution H 33342 (1:1000, B2261, Sigma-Aldrich) and were washed once with PBS before mounting with antifading Fluoromount G medium (FP-483331, Interchim). Slides were stored at 4°C protected from light until picture acquisition.

Image acquisition and quantification

As much as possible, the various conditions to be compared (e.g., WT vs. KO, normal vs. dystrophic muscle) should be recorded in similar conditions (microscope, magnification, exposure time, binning). For Open-CSAM validation and comparison with other softwares, at least 10 images were acquired manually at $\times 20$ of magnification on an Axio Imager.Z1 microscope (Zeiss) connected to a CoolSNAP MYO CCD camera (photometrics) using MetaMorph Software (molecular devices). For whole cryosection analysis, slides were automatically scanned at $\times 10$ of magnification using an Axio Observer.Z1 (Zeiss) connected to a CoolSNAP HQ2 CCD Camera (photometrics). The image of the whole cryosection was automatically reconstituted in MetaMorph Software. Open-CSAM was able to analyze images up to 110 Mo in 8 bit or 220 Mo in 16 bit. In case the final picture was too big to be analyzed at once because of limitation of ImageJ capacities, the picture was split into several parts (two to four) for the automated analysis. Between 2000 and 4000 fibers were analyzed in a few seconds. Open-CSAM workflow is presented in Fig. 1. The detailed macro code and explanations of the various functions are given in Additional file 1: Figure S1. If necessary, at the end of the automated measurement, manual correction is performed using ImageJ. The selection tools in the ROI Manager were used to remove “false” myofibers created by the automation, and the “Freehand selections” tool was used for hand-drawing “lacking” myofibers missed by the automation. These tools were used for full manual quantification. A tutorial is provided in Additional file 2: Figure S2.

MyoVision and MuscleJ analyses were performed as described [2, 8]. SMASH analysis was implemented with



a segmentation filter set to 11 [7]. This was empirically determined by testing values between 5 and 12 and visually inspecting the results. For MuscleAnalyzer analysis, the TIFF pipeline was tested following recommendations provided in the tutorial video [11]. Several threshold values were tested from 1 to 0.955 with no difference on the results. In all analyses, the applied size filter was the same as the one used for Open-CSAM (Table 1).

Statistical analyses

All images were acquired from at least two independent TA muscles per experimental condition and at least five randomly selected images per muscle were analyzed.

Table 1 Recommended size and circularity thresholds

Muscle type	Size threshold	Circularity threshold
D0 (young and old)	200 μm^2 *	0.4
D8	50 μm^2 then adjust*	0.4
D14	100 μm^2 then adjust*	0.4
D28 (young and old)	150 μm^2 then adjust*	0.4
Fib-mdx	50 μm^2	0.4

*If too many small myofibers are missed, progressively decrease the size threshold by testing on 2–3 representative pictures

The Student *t* test, two-way ANOVA, or Spearman correlation test were used for statistical analyses. $P < 0.05$ was considered significant.

Results

Open-CSAM is more accurate than previously described softwares

In order to test the accuracy of Open-CSAM, its performance was compared with a fully manual quantification, a semi-automated software (SMASH), as well as two fully automated softwares: MyoVision and MuscleJ (Fig. 2). We analyzed TA muscle from various conditions, including uninjured muscle, regenerating muscle at several time points after acute injury (D8 and D14) in young and old mice, and a model of fibrotic dystrophy (Fib-mdx). Quantification was performed on cryosections immunofluorescently labeled with anti-laminin antibody, which labels the myofiber basal lamina. Immunolabeling against dystrophin or sarcolemal proteins was not used as this precludes the analysis in dystrophies where these proteins are lacking or altered. As previously described [2], MyoVision produced significantly higher mean CSA values as compared with manual quantification (Fig. 2a, between 4.3 and 47.7% increase depending on the experimental condition). Mean CSA values obtained with MuscleJ were similar to the manual quantification for uninjured young as well as 14 and 28 days post-injury muscles. However, it gave higher mean CSA values in 8 days post-injury regenerating muscles, old muscles (uninjured and 28 days post-injury), and dystrophic muscles (Fig. 2a, between 3.2 and 19.4% increase). Mean CSA values obtained with SMASH were very close to the manual quantification in uninjured old and young 8- and 28-days post-injury muscles. However, SMASH produced higher mean CSA values in uninjured muscles (young and old) (+3 and +1%, respectively), and lower mean CSA values in 14 days post-injury muscles (-4%) (Fig. 2a). On the other hand, Open-CSAM without manual correction gave mean CSA values close to those obtained manually, with a slight underestimation (between 2 and 7.3% decrease as compared with manual quantification), except in Fib-mdx muscles where it was slightly overestimated (+4.4%) (Fig. 2a). This was explained by the fact that Open-CSAM measured the area inside the basal lamina staining, which corresponds to the true area of the myofiber. With manual quantification, the experimenter tends to draw the limits of the myofibers more on the laminin staining, thus including a small part of the basal lamina, therefore slightly overestimating the myofiber area (Fig. 2a). In the case of Fib-mdx muscle, the overestimation by

Open-CSAM was explained by an oversight of small myofibers (see below). During the revision process of this manuscript, MuscleAnalyzer, a customized pipeline within the CellProfiler program allowing fully automated CSA measurement, was released [11]. We tested this pipeline on the same samples as above (Additional file 3: Figure S3). As it strongly overestimated mean CSA as compared with manual quantification (between 38.4% and 254.8% increase depending on the condition), this software was not considered for further analysis.

Despite an increased CSA value obtained using MyoVision, the correlation between MyoVision and manual quantification for each picture was strong in uninjured muscles (young and old mice), as well as 14 and 28 days post-injury regenerating muscles (Fig. 2b and Additional file 4: Figure S4A, $R^2 > 0.95$), suggesting that in these conditions, CSA overestimation by MyoVision was similar on all the pictures and did not introduce a specific bias. On the contrary, the correlation was much lower on muscles at 8 days post-injury, 28 days post-injury in old mice and in fibrotic muscles (Fig. 2b and Additional file 4: Figure S4A, $R^2 < 0.89$), which represent conditions exhibiting smaller myofibers and/or defects in regeneration. Similarly, overall correlation between MuscleJ and manual quantification was very strong in uninjured muscles (young and old mice, Fig. 2b and Additional file 4: Figure S4A, $R^2 > 0.97$). Although this correlation was lower on young 8 days and old 28 days post-injury as well as on fibrotic muscles, it was better than MyoVision. Finally, correlation was lower with MuscleJ than with MyoVision for the 14 and 28 days post-injury conditions. Correlation between SMASH and manual quantification was strong in uninjured young muscles (Fig. 2b, $R^2 = 0.97$). However, correlation was less good when compared with MyoVision and MuscleJ in 28 days post-injury muscles (young and old mice, Additional file 4: Figure S4A, $R^2 = 0.8352$ for young and 0.9278 for old). For all other conditions, SMASH accuracy compared with manual quantification was intermediate between that of MyoVision and of MuscleJ (Additional file 4: Figure S4A, $0.8489 < R^2 < 0.9364$). These data indicate that the differences observed between manual quantification and MyoVision, MuscleJ, or SMASH are condition-dependent, thus introducing a bias. We then used Open-CSAM, first without applying any manual correction. The correlation between Open-CSAM and manual quantification was better or equivalent to that of MyoVision, MuscleJ, or SMASH in all the analyzed experimental conditions (Fig. 2b and Additional file 4: Figure S4A, $R^2 > 0.9454$). This suggests that Open-CSAM performance was more consistent through the various experimental conditions.

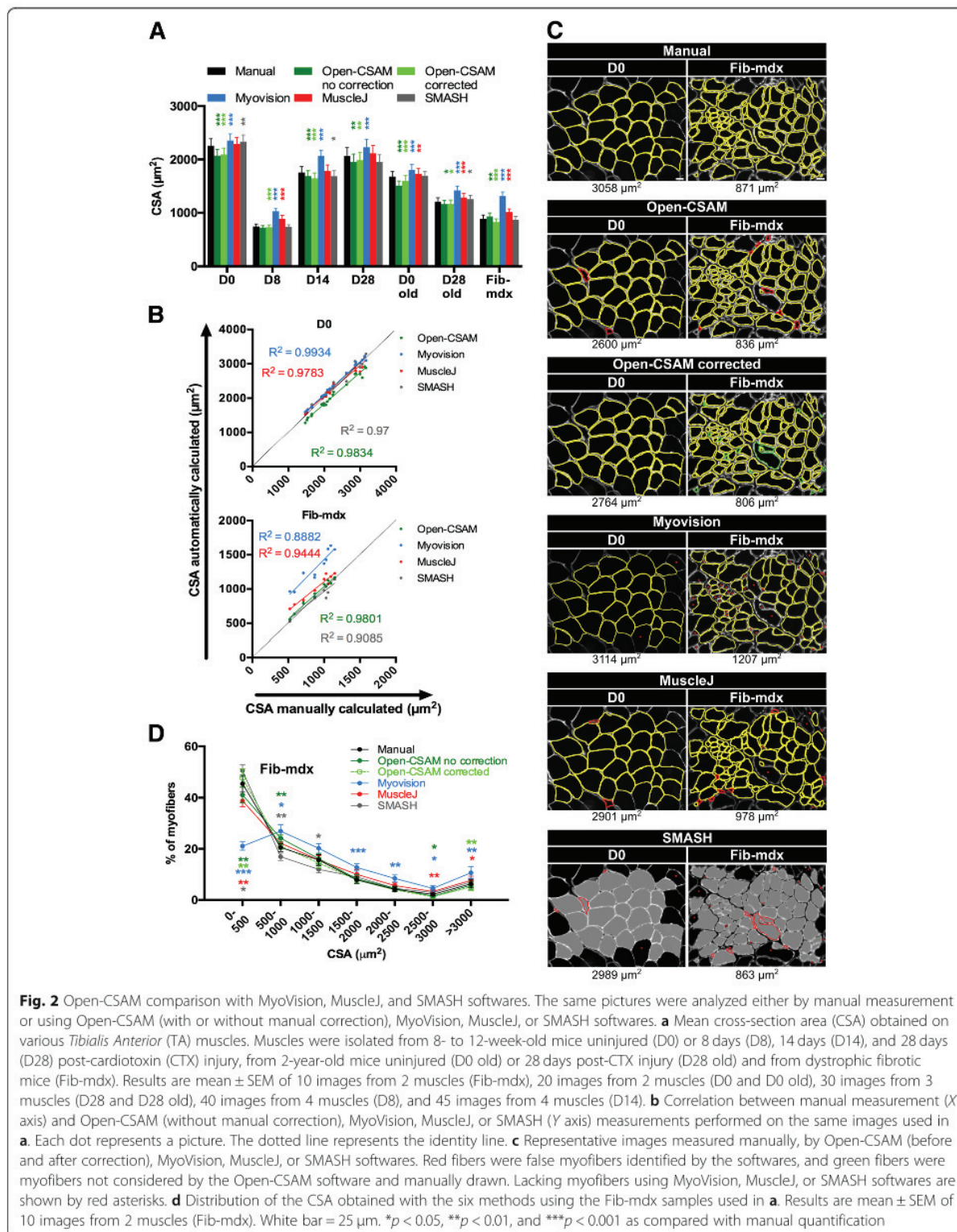


Fig. 2 Open-CSAM comparison with MyoVision, MuscleJ, and SMASH softwares. The same pictures were analyzed either by manual measurement or using Open-CSAM (with or without manual correction), MyoVision, MuscleJ, or SMASH softwares. **a** Mean cross-section area (CSA) obtained on various *Tibialis Anterior* (TA) muscles. Muscles were isolated from 8- to 12-week-old mice uninjured (D0) or 8 days (D8), 14 days (D14), and 28 days (D28) post-cardiotoxin (CTX) injury, from 2-year-old mice uninjured (D0 old) or 28 days post-CTX injury (D28 old) and from dystrophic fibrotic mice (Fib-mdx). Results are mean \pm SEM of 10 images from 2 muscles (Fib-mdx), 20 images from 2 muscles (D0 and D0 old), 30 images from 3 muscles (D28 and D28 old), 40 images from 4 muscles (D8), and 45 images from 4 muscles (D14). **b** Correlation between manual measurement (X axis) and Open-CSAM (without manual correction), MyoVision, MuscleJ, or SMASH (Y axis) measurements performed on the same images used in **a**. Each dot represents a picture. The dotted line represents the identity line. **c** Representative images measured manually, by Open-CSAM (before and after correction), MyoVision, MuscleJ, or SMASH softwares. Red fibers were false myofibers identified by the softwares, and green fibers were myofibers not considered by the Open-CSAM software and manually drawn. Lacking myofibers using MyoVision, MuscleJ, or SMASH softwares are shown by red asterisks. **d** Distribution of the CSA obtained with the six methods using the Fib-mdx samples used in **a**. Results are mean \pm SEM of 10 images from 2 muscles (Fib-mdx). White bar = 25 μm . * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$ as compared with manual quantification

Manual correction is necessary for best accuracy

Figure 2c shows two examples of quantification performed on a single image from an uninjured muscle (left panel) and a dystrophic fibrotic muscle (right panel). In the uninjured muscle picture, Open-CSAM and MuscleJ identified two false myofibers (red lines), which were manually removed with Open-CSAM (Open-CSAM corrected). On the other hand, MyoVision missed two myofibers (red asterisks) while SMASH both identified three false myofibers and missed two myofibers. However, as the myofiber size was quite homogeneous in this picture, this did not really impact the calculated CSA value. In the fibrotic muscle picture (Fig. 2c, right panel), Open-CSAM identified 7 false myofibers (red lines) and missed 16 myofibers that were manually corrected afterwards (green lines). MyoVision missed 33 myofibers (red asterisks) and identified 1 false fiber, which could be excluded by size filter in MyoVision software (red line), inducing a 29% artificial increase in CSA, as compared with manual quantification. Similarly, MuscleJ identified 7 false myofibers (red lines) and missed 14 fibers (red asterisks), leading to a 12.3% increase as compared with manual quantification. Finally, SMASH missed 14 myofibers and misidentified 9 fibers, leading to an 8.2% decrease of mean CSA compared to manual quantification. The distribution of the myofiber CSA in Fib-mdx muscles (same samples as in Fig. 2a) clearly showed that MyoVision and MuscleJ, and to a lower extent, Open-CSAM, preferentially missed the small myofibers ($< 500 \mu\text{m}^2$) (Fig. 2d), thus artificially overestimating the mean CSA. On the contrary, SMASH overestimated the proportion of small myofibers. Taken together, these results show that Open-CSAM accuracy is more consistent as compared with other softwares through various experimental conditions. However, despite its performance, manual correction is necessary for best accuracy. Open-CSAM was designed to enable easy manual correction, allowing the user to directly draw missing fibers and delete the false ones at the same time in ImageJ (Additional file 2: Figure S2). As shown in Additional file 4: Figure S4B, manual correction applied to Open-CSAM improved the measurement accuracy in all conditions ($R^2 > 0.97$) except in old mice 28 days post-injury ($R^2 = 0.9665$ before and 0.962 after correction). In Fib-mdx muscle, this was associated with a convergence of the overall myofiber size distribution towards the distribution obtained with manual quantification (Fig. 2d), notably with a better consideration of small myofibers ($< 500 \mu\text{m}^2$).

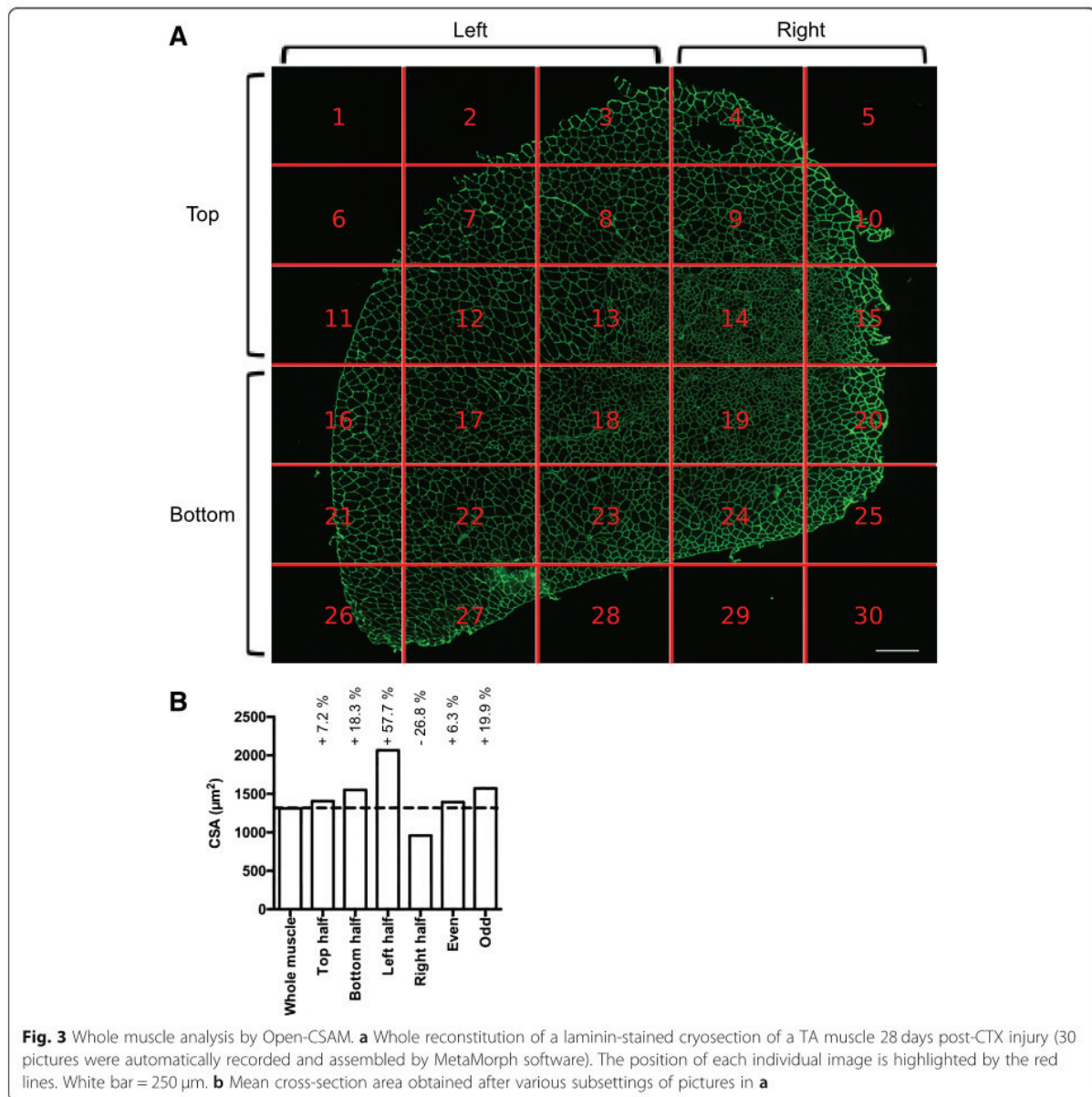
Whole section analysis is necessary for best accuracy

CSA analysis is usually performed on a subset of images randomly taken throughout the muscle section. Depending on the experimenter, the number of images and thus the number of analyzed myofibers can be variable. Moreover,

within the same muscle, myofiber size can be quite heterogeneous and a bias can be introduced depending on the choice of the pictures. Figure 3a shows an example of an entire reconstituted muscle picture. We measured CSA on individual images, calculated the mean CSA on several subsets of images, and compared the results with the CSA obtained on the whole section. When the measurement was made only using a subset of pictures, the myofiber CSA differed from 5 to 28% to that measured on the whole muscle (Fig. 3b). We particularly observed that CSA was overestimated when the left half of the muscle was measured, that corresponded in this example to the peripheral part of the muscle where regeneration is ended. Inversely, measuring the right part of the muscle, here corresponding to smaller regenerating myofibers localized at the center of the muscle, underestimated CSA value. Thus, because TA regeneration after a toxic injury is a centripetal process that ends first at the periphery of the muscle, the whole muscle section should be analyzed when measuring CSA of regenerating muscle in order to obtain an unbiased picture of the process. Moreover, as in diseased muscle, foci of fiber damage or remodeling can occur anywhere, analyzing the whole section also insures an accurate measurement in this context.

Use of Open-CSAM is robust among users

In a whole muscle section, the number of manual corrections can be variable depending on the quality of the muscle section and of the immunostaining. Considering a high quality of both, we found that the amount of false plus lacking fibers, which needed to be manually removed or re-drawn, ranged from 5% in non-damaged muscles to 10 to 25% in damaged muscles (Fig. 4a). As the manual corrections after Open-CSAM analysis can represent up to 25% of the myofibers, thus potentially introducing variability among users, we tested the robustness of this method. To do so, three independent experimenters analyzed the same image taken from an adult TA muscle 28 days post-CTX injury, where the majority of the muscle has fully regenerated and some central areas are still regenerating (Fig. 4b, c). This muscle was chosen because of the high number of required manual corrections. Using a $100 \mu\text{m}^2$ size filter and a 0.4 circularity threshold (see Additional file 1: Figure S1 and Table 1), Open-CSAM identified 3757 fibers (Fig. 4c, left images), resulting in a CSA of $1566.8 \mu\text{m}^2$ (Fig. 4b, left). As shown in Fig. 4c, two areas showed a large number of fibers missed by Open-CSAM. The first area (blue box) was composed of fibers showing a high variability in size where Open-CSAM missed mainly very small fibers. The second area (red box) was composed of medium- to large-sized fibers but with a lower laminin staining intensity. In this area, Open-CSAM failed to identify most of the fibers. Depending on the user, 50 to 145 false fibers were deleted and 860 to 1019 fibers



were manually added (Fig. 4b, right). Despite this variability in the number of manual corrections performed by each user, the corrected CSA reached 1454, 1437, and 1456 μm^2 , meaning that variability between users was below 1%. Altogether, these results show that despite the manual corrections required by Open-CSAM, there is no bias introduced by the experimenter.

Open-CSAM is an accurate tool for whole muscle CSA analysis in regenerating muscle

As we showed that CSA quantification with Open-CSAM was highly accurate on individual images in various

experimental conditions and that whole muscle analysis was necessary, we tested its performance on several whole muscle images and compared it to fully automated quantification by MyoVision and MuscleJ, as well as to SMASH. We analyzed whole muscle images from young uninjured, 8 days post-injury and 28 days post-injury mice (Fig. 5 and Additional file 5: Figure S5). As we showed for $\times 20$ individual pictures in uninjured muscle (Fig. 2), MyoVision, MuscleJ, and SMASH modestly overestimated the CSA as compared with corrected Open-CSAM (Fig. 5a, +11.7%, +16.5%, and +13.9%, respectively) (Fig. 5a). On the same muscle, manual correction had negligible impact on

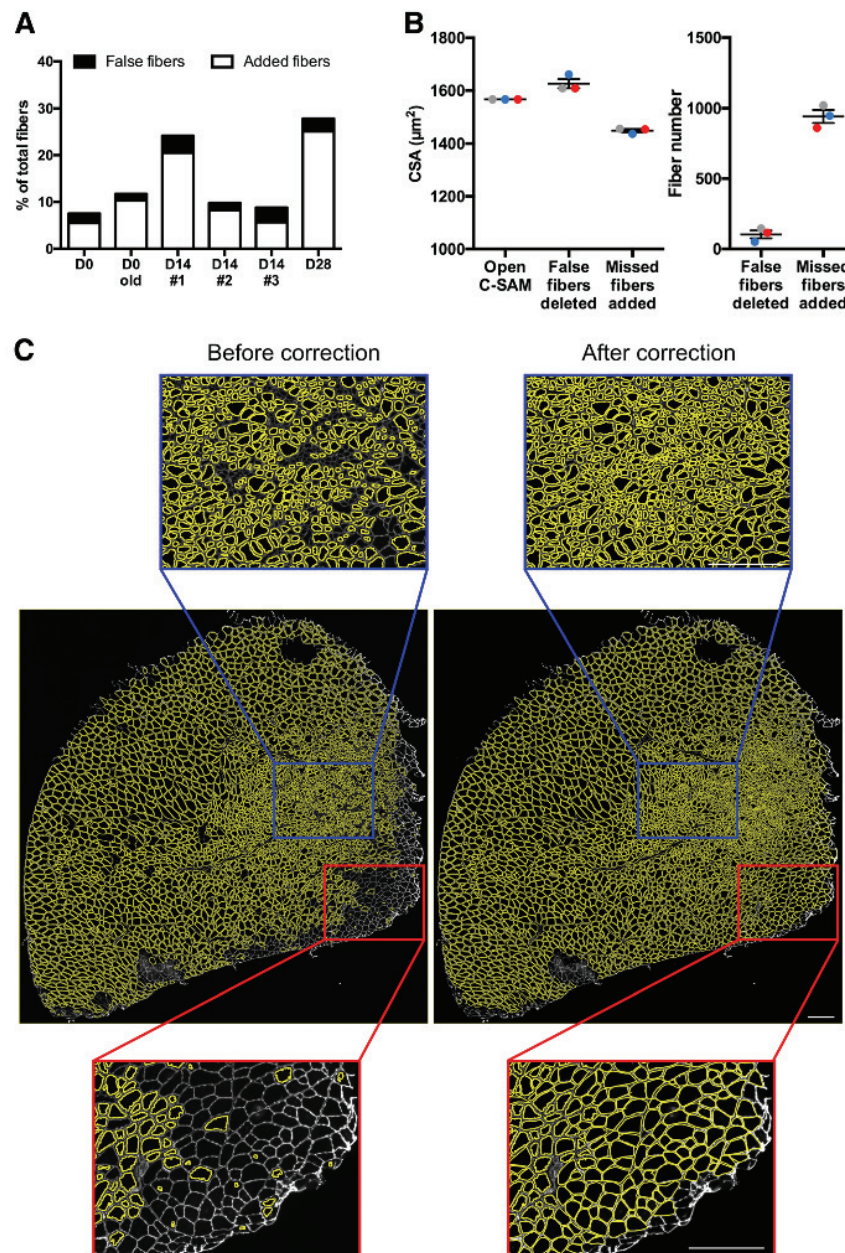
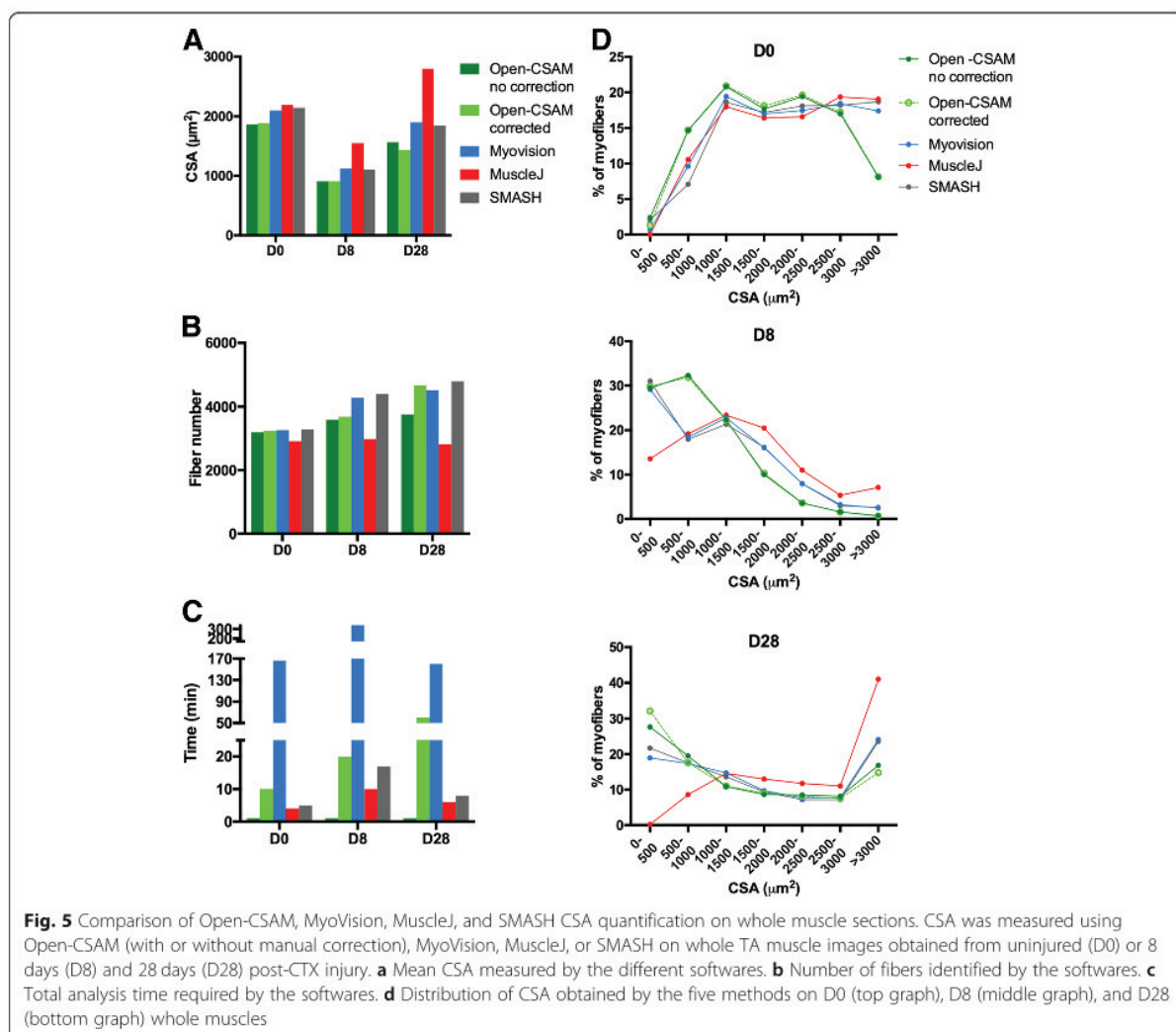


Fig. 4 Manual corrections after Open-CSAM analysis. **a** Percentage of false myofibers detected (black histograms) and missed myofibers (white histograms) by Open-CSAM that needed manual correction for TA muscles from young and old uninjured mice as well as from 3 muscles analyzed 14 days post-CTX injury. **b, c** Open-CSAM analysis of a TA muscle 28 days post-CTX injury. **b** CSA (left graph) and number of fibers manually corrected (right graph) after analysis by Open-CSAM by three different users (each color represents a single user). **c** Whole image of the TA muscle analyzed in **b** showing myofibers (yellow) detected by Open-CSAM before (left panel) and after (right panel) manual correction. Blue and red boxes represent zoom-in examples of two specific areas that needed extensive manual correction. White bar = 250 μm

CSA obtained by Open-CSAM, highlighting its high performance on uninjured whole muscle section (Fig. 5a, -1.1% before correction). Corroborating this observation, CSA distribution was identical for

Open-CSAM before and after correction (Fig. 5d). On the contrary, MyoVision, MuscleJ, and SMASH overlooked small fibers ($< 1000 \mu\text{m}^2$) and overestimated bigger fibers ($> 3000 \mu\text{m}^2$). In the D8



condition, where small fibers represent an important part of the whole muscle section area and the D28 condition, where small myofibers are still concentrated in specific areas (see Fig. 4), MyoVision (+24 and +32.1%, respectively), MuscleJ (+71.2 and +92.3%, respectively), and SMASH (+22 and 26.8%, respectively) accounted for a much higher CSA than Open-CSAM. This is mainly due to the non-detection of the small myofibers (Fig. 5d) and, in the case of MuscleJ, to the merging of several myofibers into one (Additional file 5: Figure S5B, Fig. 5b). Again, correction in Open-CSAM induced a negligible change in CSA measurement on day 8 post-injury muscle (Fig. 5a, +0.3% before correction). Finally, manual correction of Open-CSAM in day 28 post-injury muscle corrected a slight underestimation of small fibers (Fig. 5d), leading to an artificial increase in CSA (Fig. 5a, +7.8% before correction).

The main defect of Open-CSAM is the time of experimenter that is required for the complete implementation of CSA measurement. Although running Open-CSAM macro in ImageJ took less than 1 min (even for the whole muscle pictures), which was faster compared to other softwares (4 to 10 min for MuscleJ, 5 to 17 min for SMASH, and 166 to 340 min for MyoVision), the post-automation manual corrections lasted between 10 and 60 min in the examples provided (Fig. 5c, Additional file 5: Figure S5). However, those corrections are required for achieving a full analysis of the whole muscle in order to provide an accurate CSA value. Taken together, these results show that Open-CSAM is a highly accurate tool to measure myofiber CSA on whole muscle section images from different experimental conditions, including regenerating muscle.

Discussion

Histology is the gold standard technique to assess some characteristics of skeletal muscle. Measurement of myofiber CSA is classically used as a parameter of normal and pathological skeletal muscle regeneration after labeling with anti-laminin or anti-dystrophin antibodies. However, there are various strategies to analyze images and CSA measurement that can give highly heterogeneous results. On the one hand, manual quantification, consisting in manually drawing the myofiber contour to measure the area, is extremely time-consuming and potentially variable between experimenters as it is meticulousness-dependent. According to our experience, it takes about 1 h to draw 1000 fibers. On the other hand, automated programs that were developed to reduce the impact of the experimenter, and to save time, give satisfactory results in uninjured muscle [2–8] but fail to be accurate in regenerating muscle.

Among the recent described softwares are SMASH, MyoVision, and MuscleJ. SMASH is a MATLAB application which is also available as a free Windows program (SMASH Stand Alone). MyoVision is a program operating in Windows environment whereas MuscleJ is a macro working in ImageJ program (Table 2). They were developed to automate, with various levels of flexibility, the quantification of several muscle parameters including fiber number, CSA, myonuclei number and fiber type distribution. As previously described [2], MyoVision showed a significant CSA overestimation as compared with manual quantification. This could be explained by the stronger overlapping of MyoVision outlines with the laminin staining (Fig. 2c), thus integrating a part of the basal lamina into the myofiber area. Despite this overestimation of the mean CSA as compared with manual quantification, MyoVision performed accurately on isolated images from

uninjured muscles. However, regenerating, old and dystrophic muscles are characterized by high myofiber size heterogeneity. In this context, MyoVision measurement was still good at day 14 and 28 after injury, i.e. at time points when regenerating myofibers are already formed. On the contrary, correlation with manual estimation was much lower in muscles at 8 days post-injury in young mice, at 28 days post-injury in old mice and in muscles of dystrophic fibrotic mice. These three conditions are characterized by a lower mean CSA and the presence of high numbers of very small myofibers, which are not considered by MyoVision, thus overestimating the mean CSA. MuscleJ software was efficient in measuring mean CSA in individual \times 20 pictures from uninjured young as well as 14 and 28 days post-injury muscles. However, it measured higher mean CSA values in 8 days post-injury regenerating muscles, old muscles (uninjured and 28 days post-injury) and dystrophic muscles, even though the values were closer to manual quantification than that calculated by MyoVision. Here again, this was due to an oversight of small myofibers. Finally, SMASH showed high accuracy in uninjured young muscles. For the other conditions, even though mean CSA was relatively close to manual quantification, the accuracy was very variable between images, leading to overestimation of small myofibers in Fib-mdx (Fig. 2d) and oversight of these same small fibers in regenerating muscles (Fig. 5d), making it not reliable to analyze and compare various conditions.

In order to provide a tool usable in various biological conditions, we developed Open-CSAM, an ImageJ macro allowing the automatic measurement of CSA with the possibility for the experimenter to apply manual corrections afterwards. CSA values obtained with Open-CSAM were very close to the values obtained manually in all tested conditions. Generally, Open-CSAM omitted only few myofibers in muscles containing small fibers

Table 2 Comparison of software characteristics

Program	Software base	OS	Minimal configuration tested		Manual correction
			PC	MAC	
Open-CSAM	ImageJ plugin	Mac OS/Windows	Windows 10-Intel core i3 CPU 550 3.2 GHz-4 Go RAM	Mac OS 10.12/Intel core i3-3.2 GHz/12 Go RAM	Yes—during the analysis → Draw/delete ImageJ tools
MyoVision	Windows application	Windows	Windows 10-Intel core i3 CPU 550 3.2 GHz-4 Go RAM (single image analysis)/Windows 7-Intel core i5 vpro 3.1 GHz/16 Go RAM (whole muscle analysis)	Not applicable	No
MuscleJ	ImageJ plugin	Mac OS/Windows	Windows 10-Intel core i3 CPU 550 3.2 GHz-4 Go RAM	Mac OS 10.13/Intel core i5-2.7 GHz/16 Go RAM	Yes—after the analysis → Open picture → Import ROI file on the picture → Draw/delete ImageJ tools
SMASH Stand Alone	Windows application	Windows	Windows 10-Intel core i3 CPU 550 3.2 GHz-4 Go RAM	Not applicable	Yes—during the analysis → Step 1 draw—validate → Step 2 delete—validate (cumbersome: small screen, no back and forth allowed between steps 1 and 2)

(regenerating muscle, old muscle, dystrophic muscles). Then, lacking myofibers are easily manually drawn and incorporated into the analysis using ImageJ, which is not possible using the fully automated softwares. The main drawback of Open-CSAM is that it identifies some false myofibers in the interstitial space between myofibers, notably when this space is large in early regenerating and fibrotic muscles. This issue can be overcome by increasing the size and the circularity thresholds but this also increases the risk of omitting real myofibers. Because it is faster to delete false myofibers than manually drawing lacking myofibers, we recommend to keep thresholds as low as possible to reduce the number of lacking myofibers. We therefore provided starting thresholds for the different conditions we have tested, that have to be adjusted depending on the specific experiment (Table 1). According to our experience, the false fibers identified by Open-CSAM represented less than 5% of the total fibers in all the muscles we have analyzed so far.

CSA measurement is usually performed on a subset of images randomly taken throughout the muscle section. However, myofiber size is quite heterogeneous within the same muscle, and we showed that considering only a part of the muscle section led to the introduction of bias depending on the image selection, potentially hiding a relevant phenotype or artificially creating a non-relevant one. Of note, image acquisition and reconstitution of the whole muscle section is automatically performed, saving time, as compared with manually recording random pictures. Then, Open-CSAM is capable of measuring the myofiber CSA on the whole section in a few seconds. Depending on the size of the image, it may be necessary to split it in two or four parts. This may be also useful when the laminin labeling intensity is not homogenous on the entire section since Open-CSAM may omit faint labeled areas.

When measuring CSA on whole muscle section pictures, using uninjured or 8-day and 28-day regenerating muscles, we found that Open-CSAM (including the manual post-automation corrections) was the most accurate way to measure myofiber CSA. MuscleJ program was efficient at implementing CSA from uninjured muscle (still with overestimated values) but failed to accurately measure myofiber CSA of regenerating muscle, due to failure to detect small fibers and to merging of several myofibers into one. Even though MuscleJ was built as a ready-to-use toolbox to avoid experimenter intervention, post-automation corrections are possible. Indeed, the user may generate a file containing the ROIs analyzed that can be imported back into ImageJ to perform manual corrections in a similar way as Open-CSAM. However, given its poor performance on whole regenerating muscle section as compared with Open-CSAM, the amount of manual corrections and thus the time spent would be not competitive towards Open-CSAM

measurement. SMASH and MyoVision gave similar results, as they moderately overestimated mean CSA in uninjured muscle, an overestimation that was amplified in 8-day and 28-day regenerating muscles which contain a higher proportion of small rounded-shape myofibers. MyoVision was very slow in implementing the analysis of the whole muscle images (between 166 and 340 min), making it not competitive towards manual measurement. Moreover, it does not allow manual correction. SMASH was faster (between 5 and 17 min), and it was designed to allow the user to perform manual corrections during the analysis. However, the correction process has several drawbacks. First, the application cannot be displayed into full screen, which makes inconvenient to easily detect the myofiber delimitations. Second, after the segmentation, the correction process is composed of 2 sequential steps. The first step allows to manually split merged fibers or draw the missed ones. After validation of the drawing, the second step allows manual deletion of the false fibers identified by the program. Unfortunately, at this point, it is not possible anymore to come back to correct merged or missed fibers that would have appeared after the second step. Given this lack of flexibility, performing manual correction in Open-CSAM is much easier and faster.

According to our experience with Open-CSAM, the amount of manual corrections required after the automatic measurement depends on the status of the muscle, the quality of the cryosection, and the quality of the immunolabeling. We recommend performing a new cryosection and/or labeling rather than trying to analyze poor quality images. Typically, if we consider a high-quality image, the analysis of an uninjured TA lasts less than 15 min to process 2000 to 3000 myofibers. In the worst condition we experienced, processing of a regenerating TA can last from 15 min to 1 h for the experimenter to obtain an accurate measurement of myofiber CSA (as compared with 1 h per 1000 fibers in the case of a full manual quantification, thus 2–3 h per muscle). Moreover, we showed that despite the relatively high level of manual correction required for some muscles, the difference in corrected CSA obtained by independent experimenters was negligible (less than 1%), highlighting the robustness of this method.

Conclusion

The use of Open-CSAM program on whole muscle sections is a powerful strategy to measure myofiber CSA of muscles from various experimental conditions in an easy, highly accurate, and reproducible way, providing values very close to the absolute values. This user-friendly (tutorial in Additional file 2: Figure S2) method is semi-automated and therefore requires the commitment of the experimenter (who is still the best expert to define what a myofiber is), allowing the most accurate CSA measurement of regenerating muscle so far.

Additional files

Additional file 1: Figure S1. Macro to be run for the implementation of Open-CSAM program (left) and related explanations of the functions (right column). (PDF 31.1 kb)

Additional file 2: Figure S2. Tutorial for the use of Open-CSAM. (PDF 785 kb)

Additional file 3: Figure S3. The same pictures as in Fig. 2 were analyzed either by manual measurement or using MuscleAnalyzer. The mean CSA obtained with the two methods is shown. $***p < 0.001$ as compared with manual quantification by two-way ANOVA analysis. (PDF 80 kb)

Additional file 4: Figure S4. Mean CSA was measured manually and with Open-CSAM, MyoVision, MuscleJ, or SMASH softwares on the same samples as described in Fig. 2a. Muscles were isolated from 8- to 12-week-old mice 8 days (D8), 14 days (D14), and 28 days (D28) post-CTX injury, from uninjured (D0 old) or 28 days post-CTX injury (D28 old) 2-year-old mice. **A** The correlation between manual measurement (X axis) and Open-CSAM (without manual correction), MyoVision, MuscleJ, or SMASH (Y axis) measurements is presented. **B** Correlation between manual measurement (X axis) and Open-CSAM (Y axis) before and after manual correction. Each dot represents a picture. The dotted line represents the identity line. (PDF 833 kb)

Additional file 5: Figure S5. CSA was measured using Open-CSAM, MyoVision, MuscleJ, or SMASH softwares on whole TA muscle images obtained from uninjured (D0) or 8 days (D8) and 28 days (D28) post-CTX injury. **A** Pictures showing the myofibers (yellow shapes except for SMASH which is in gray) detected by Open-CSAM, MyoVision, SMASH, and MuscleJ. The white dotted lines show where the images were split for Open-CSAM and MyoVision analysis. **B** Red boxes represent zoom-in examples of specific areas obtained by MuscleJ. Red asterisks show examples of group of myofibers that are merged. White bar = 250 μ m. (PDF 12792 kb)

Abbreviations

CSA: Cross-sectional area; CTX: Cardiotoxin; Fib-mdx: Fibrotic dystrophic mice; ROI: Region of interest; TA: Tibialis anterior

Funding

Chazaud Lab is funded by CNRS, INSERM, and UCBL.

Availability of data and materials

N/A.

Authors' contributions

RM and BC helped in the conceptualization. TD, SLy, BC, DR, JG, RM, BC, and GJ contributed to the methodology. TD, JG, RM, BC, and GJ helped in the validation and formal analysis. TD, SLi, SLy JB, AK, AT, and GJ carried out the investigation. TD and GJ wrote the original draft and helped in the visualization. TD, SL, AT, DR, JG, RM, BC, and GJ helped in writing the review and editing. BC and GJ supervised the study. All authors read and approved the final manuscript.

Ethics approval and consent to participate

N/A

Consent for publication

N/A

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Author details

¹Institut NeuroMyoGène, Univ Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, CNRS UMR 5310, INSERM U1217, 8 Avenue Rockefeller, F-69008 Lyon, France.

²CREATIS, Univ Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, CNRS UMR 5220, INSERM U1206, INSA Lyon, 69100 Villeurbanne, France. ³CIQLE, Lyon Bio Image, Univ Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, Structure Fédérative de Recherche santé Lyon-Est CNRS UMS3453/INSERM US7, 69008 Lyon, France.

Received: 17 September 2018 Accepted: 4 December 2018

Published online: 08 January 2019

References

- Yin H, Price F, Rudnicki MA. Satellite cells and the muscle stem cell niche. *Physiol Rev.* 2013;93:23–67.
- Wen Y, Murach KA, Vechetti IJ Jr, Fry CS, Vickery C, Peterson CA, et al. MyoVision: software for automated high-content analysis of skeletal muscle immunohistochemistry. *J Appl Physiol.* 2018;124:40–51.
- Miazaki M, Viana MP, Yang Z, Comin CH, Wang Y, Costa L d F, et al. Automated high-content morphological analysis of muscle fiber histology. *Comput Biol Med.* 2015;63:28–35 Elsevier.
- Liu F, Fry CS, Mula J, Jackson JR, Lee JD, Peterson CA, et al. Automated fiber-type-specific cross-sectional area assessment and myonuclei counting in skeletal muscle. *J Appl Physiol.* 2013;115:1714–24.
- Kostrominova TY, Reiner DS, Haas RH, Ingermanson R, McDonough PM. Automated methods for the analysis of skeletal muscle fiber size and metabolic type. *Int Rev Cell Mol Biol.* 2013;306:275–332.
- Kim Y-J, Brox T, Feiden W, Weickert J. Fully automated segmentation and morphometrical analysis of muscle fiber images. *Cytometry.* 2007;71A:8–15.
- Smith LR, Barton ER. SMASH—semi-automatic muscle analysis using segmentation of histology: a MATLAB application. *Skelet Muscle.* 2014;4:21–16.
- Mayeuf-Louchart A, Hardy D, Thorel Q, Roux P, Gueniot L, Briand D, et al. Muscle J: a high-content analysis method to study skeletal muscle with a new Fiji tool. *Skelet Muscle.* 2018;8:25.
- Théret M, Gsaier L, Schaffer B, Juban G, Ben Larbi S, Weiss Gayet M, et al. AMPK α 1-LDH pathway regulates muscle stem cell self-renewal by controlling metabolic homeostasis. *EMBO J.* 2017;36:1946–62.
- Desguerre I, Arnold L, Vignaud A, Cuvellier S, Yacoub-Youssef H, Gherardi RK, et al. A new model of experimental fibrosis in hindlimb skeletal muscle of adult mdx mouse mimicking muscular dystrophy. *Muscle Nerve.* 2012;45:803–14.
- Lau YS, Xu L, Gao Y, Han R. Automated muscle histopathology analysis using CellProfiler. *Skelet Muscle.* 2018;8:32.

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more biomedcentral.com/submissions



PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES

Desgeorges T., Liot S., Lyon S., **Bouviere J.**, Kemmel A., Trignol A., Rousseau D., Chapuis B., Gondin J., Mounier R., Chazaud B. and Juban G. “**Open-CSAM, a New Tool for Semi-Automated Analysis of Myofiber Cross-Sectional Area in Regenerating Adult Skeletal Muscle.**” *Skeletal Muscle* 9, no. 1, 2019.

Bouviere J*, Trignol A*, Weiss-Gayet M, Goriot M, Chiappini F, Sineriz F, Delcarmine P, Mounier R, Barritault D, Banzet S, Chazaud B “**Heparan sulfate mimetic ReGenerating Agents accelerate post-injury skeletal muscle regeneration.**” *Tissue Engineering, Part A* 2019.

COMMUNICATIONS ORALES

Keystone Symposia, *Transcription and RNA Regulation in Inflammation and Immunity*, California - USA (California, USA – February 2019) “SELENOPROTEINS REGULATE MACROPHAGE POLARIZATION AND FUNCTION.”

King’s College London - Knight’s Laboratory (London/United Kingdom – July 2017) “SELENOPROTEINS SECRETED BY MACROPHAGES MODULATE MYOGENESIS.”

Journée de l’Ediss (Villeurbanne, France – October 2018) “ROLE OF MACROPHAGE-SECRETED MOLECULES IN MYOGENESIS.”

Institut NeuroMyoGène (Lyon, France - December 2016) “ROLE OF MACROPHAGE-SECRETED MOLECULES IN MYOGENESIS.”

ANIMATION SCIENTIFIQUE

Co-organisatrice du Congrès “Developmental and Cell Biology of the Future” (Paris, France 27-29 mars 2019) en partenariat avec “Instituts thématiques multi-organismes” (ITMO); “Biologie cellulaire, développement et evolution” (BCDE); “Société de Biologie Cellulaire de France” (SBCF) et “Société Française de Biologie du Développement” (SFBD).

Références bibliographiques

Abou-Khalil R, Le Grand F, Pallafacchina G, et al. Autocrine and Paracrine Angiopoietin 1/Tie-2 Signaling Promotes Muscle Satellite Cell Self-Renewal. *Cell Stem Cell*. 2009;5(3):298-309. doi:10.1016/j.stem.2009.06.001

Aderem A, Underhill DM. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu Rev Immunol*. 1999;17:593-623. doi:10.1146/annurev.immunol.17.1.593

Aderem A, Underhill DM. Mechanisms of Phagocytosis in Macrophages. *Annu Rev Immunol*. 2002;17(1):593-623. doi:10.1146/annurev.immunol.17.1.593

Akbaba G, Akbaba E, Sahin C, et al. The relationship between gestational diabetes mellitus and selenoprotein-P plasma 1 (SEPP1) gene polymorphisms. *Gynecol Endocrinol*. 2018;34(10):849-852. doi: 10.1080/09513590.2018.1460659

Al-Khalili L, Bouzakri K, Glund S, et al. Signaling Specificity of Interleukin-6 Action on Glucose and Lipid Metabolism in Skeletal Muscle. *Mol Endocrinol*. 2006;20(12):3364-3375. doi:10.1210/me.2005-0490

Al-Taie OH, Uceyler N, Eubner U, et al. Expression profiling and genetic alterations of the selenoproteins GI-GPx and SePP in colorectal carcinogenesis. *Nutr Cancer*. 2004;48(1):6-14. doi:10.1207 / s15327914nc4801_2

Alessandrino F, Balconi G. Complications of muscle injuries. *J Ultrasound*. 2013;16(4):215-222. doi:10.1007/s40477-013-0010-4

Amit S, Hatzubai A, Birman Y, et al. Axin-mediated CKI phosphorylation of beta-catenin at Ser 45: a molecular switch for the Wnt pathway. *Genes Dev*. 2002;16(9):1066-76. doi:10.1101/gad.230302

An BC, Choi Y, Id IO, et al. GPx3-mediated redox signaling arrests the cell cycle and acts as a tumor suppressor in lung cancer cell lines. *Plos One*. 2018;27;13(9):1-17. doi: 10.1371/journal.pone.0204170

Anderson CF, Mosser DM. A novel phenotype for an activated macrophage: the type 2 activated macrophage. *J leukoc Biol*. 2002;72(1):101-106. doi:10.1189/jlb.72.1.101

Andrew DP, Chang MS, McNinch J, et al. STCP-1 (MDC) CC chemokine acts specifically on chronically activated Th2 lymphocytes and is produced by monocytes on stimulation with Th2 cytokines IL-4 and IL-13. *J Immunol*. 1998;161(9):5027-38. <https://www.jimmunol.org/content/161/9/5027/tab-article-info>

Aribi M, Meziane W, Habi S, et al. Macrophage Bactericidal Activities against Staphylococcus aureus Are Enhanced In Vivo by Selenium Supplementation in a Dose-Dependent Manner. *PLoS One*. 2015;10(9):e0135515. doi: 10.1371/journal.pone.0135515

Arnold L, Henry A, Poron F, et al. Inflammatory monocytes recruited after skeletal muscle injury switch into antiinflammatory macrophages to support myogenesis. *J Exp Med*. 2007;204(5):1057-1069. doi:10.1084/jem.20070075

Arnold L, Perrin H, De Chanville CB, et al. CX3CR1 deficiency promotes muscle repair and regeneration by enhancing macrophage ApoE production. *Nat Commun.* 2015;(6):8972. doi:10.1038/ncomms9972

Arteel GE, Franken S, Kappler J, et al. Binding of Selenoprotein P to Heparin : Characterization with Surface Plasmon Resonance. *Biol Chem.* 2000;381(3):265-268. doi: 10.1515/BC.2000.034

Avery JC, Hoffmann PR. Selenium, Selenoproteins, and Immunity. *Nutrients.* 2018;10(9):1203. doi: 10.3390/nu10091203

Baez-duarte BG, Mendoza-carrera F, Garc A, et al. Glutathione Peroxidase 3 Serum Levels and GPX3 Gene Polymorphisms in Subjects with Metabolic Syndrome. *Arch Med Res.* 2014 ;45(5) :375-382. doi:10.1016/j.arcmed.2014.05.001

Baltgalvis KA, Greising SM, Warren GL, et al. Estrogen regulates estrogen receptors and antioxidant gene expression in mouse skeletal muscle. *PLoS One.* 2010;5(4):e10164. doi: 10.1371/journal.pone.0010164.

Baardman J, Verberk SGS, Prange KHM et al. A Defective Pentose Phosphate Pathway Reduces Inflammatory Macrophage Responses during Hypercholesterolemia. *Cell Rep.* 2018;25(8):2044-2052.e5. doi: 10.1016/j.celrep.2018.10.092

Barbosa I, Morin C, Garcia S, et al. A synthetic glycosaminoglycan mimetic (RGTA) modifies natural glycosaminoglycan species during myogenesis. *J Cell Sci.* 2005;118(1):253-64. doi:10.1242/jcs.01607

Barbier-Chassefiere V, Garcia-Filipe S, Yue XL, et al. Matrix therapy in regenerative medicine, a new approach to chronic wound healing. *J Biomed Mater Res A.* 2009;90(3):641-7. doi:10.1002/jbm.a.32124

Barros MHM, Hauck F, Dreyer JH, Kempkes B, Niedobitek G. Macrophage polarisation: An immunohistochemical approach for identifying M1 and M2 macrophages. *PLoS One.* 2013;8(11):1-11. doi:10.1371/journal.pone.0080908

Barrett JP, Costello DA, O'Sullivan J, et al. Bone marrow-derived macrophages from aged rats are more responsive to inflammatory stimuli. *J Neuroinflammation.* 2015;12:67. doi:10.1186/s12974-015-0287-7.

Baumhofer JM, Beinhauer BG, Wang JE, et al. Gene transfer with IL-4 and IL-13 improves survival in lethal endotoxemia in the mouse and ameliorates peritoneal macrophages immune competence. *Eur J Immunol.* 1998;28(2):610-615. doi:10.1002/(SICI)1521-4141(199802)28:02<610::AID-IMMU610>3.0.CO;2-5

Bellinger FP, Raman AV, Reeves MA, et al. Regulation and function of selenoproteins in human disease. *Biochem J.* 2009;422(1):11-22. doi: 10.1042/BJ20090219

Bentzinger CF, Wang YX, Dumont NA, et al. Cellular dynamics in the muscle satellite cell niche. *EMBO Rep.* 2013;14(12):1062-1072. doi:10.1038/embor.2013.182

Bentzinger CF, Wang YX, Rudnicki MA. Building muscle: molecular regulation of myogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2012;4(2):008342. doi:10.1101/cshperspect.a008342

Bermano G, Nicol F, Dyer JA, Sunde RA, et al. Tissue-specific regulation of selenoenzyme gene expression during selenium deficiency in rats. *Biochem J.* 1995;311:425-30. doi: 10.1042/bj3110425

Bocco BM, Louzada RA, Silvestre DH, et al. Thyroid hormone activation by type 2 deiodinase mediates exercise-induced peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator-1 α expression in skeletal muscle. *J Physiol.* 2016 Sep 15;594(18):5255-69. doi: 10.1113/JP272440

Bodine SC, Stitt TN, Gonzalez M, et al. Akt/mTOR pathway is a crucial regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy in vivo. *Nat Cell Biol.* 2001;3(11):1014-9. <https://www.nature.com/articles/ncb1101-1014>

Borras C, Gambini J, Vina J. Mitochondrial oxidant generation is involved in determining why females live longer than males. *Front Biosci.* 2007;12:1008-13. doi: 10.2741/2120

Bosurgi L, Corna G, Vezzoli M, et al. Transplanted Mesoangioblasts Require Macrophage IL-10 for Survival in a Mouse Model of Muscle Injury. *J Immunol.* 2012;188(12):6267-6277. doi:10.4049/jimmunol.1102680

Bouviere J, Trignol A, Hoang DH et al. Heparan sulfate mimetic accelerate post-injury skeletal muscle regeneration. *Tissue Eng Part A.* 2019 May 7 (Epub ahead of print). doi: 10.1089/ten.TEA.2019.0058

Boyle JJ, Harrington HA, Piper E, et al. Coronary Intraplaque Hemorrhage Evokes a Novel Atheroprotective Macrophage Phenotype. *Am J Pathol.* 2009;174(3):1097-1108. doi:10.2353/ajpath.2009.080431

Boyle JJ, Johns M, Lo J, et al. Role in the Homeostatic Macrophage Response to Intraplaque Hemorrhage. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011, 31(11):2685-2691. doi:10.1161/ATVBAHA.111.22581

Brigitte M, Schilte C, Plonquet A, et al. Muscle resident macrophages control the immune cell reaction in a mouse model of notexin-induced myoinjury. *Arthritis Rheum.* 2010;62(1):268-279. doi:10.1002/art.27183

Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature.* 2001;414(6865):813-820. doi.org/10.1038/414813a

Burk RF, Hill KE, Boeglin ME, et al. Selenoprotein P associates with endothelial cells in rat tissues. *Histochem Cell Biol.* 1997;108(1):11-5. doi:10.1007/s004180050141

Burk RF, Hill KE. Selenoprotein P: An Extracellular Protein with Unique Physical Characteristics and a Role in Selenium Homeostasis. *Annu Rev Nutr.* 2005;25(1):215-235. doi:10.1146/annurev.nutr.24.012003.132120

Burk RF, Olson GE, Hill KE, et al. Maternal-fetal transfer of selenium in the mouse. *Faseb J* 2013;27(8):3249-3256. doi:10.1096/fj.13-231852

Burk RF, Hill KE. Regulation of Selenium Metabolism and Transport. *Annu Rev Nutr.* 2015;35:109-134 doi:10.1146/annurev-nutr-071714-034250

Burzyn D, Kuswanto W, Kolodin D, et al. A special population of regulatory T cells potentiates muscle repair. *Cell.* 2013;155(6):1282-1295. doi:10.1016/j.cell.2013.10.054.A

Brüne B, Dehne N, Grossmann N, et al. Redox control of inflammation in macrophages. *Antioxid Redox Signal.* 2013;19(6):595-637. doi: 10.1089/ars.2012.4785

Carlin LM, Stamatiades EG, Auffray C, et al. Nr4a1-dependent Ly6C(low) monocytes monitor endothelial cells and orchestrate their disposal. *Cell.* 2013 Apr 11;153(2):362-75. doi: 10.1016/j.cell.2013.03.010.

Carlson BA, Yoo MH, Sano Y, et al. Selenoproteins regulate macrophage invasiveness and extracellular matrix-related gene expression. *BMC Immunol.* 2009;10:57. doi: 10.1186/1471-2172-10-57.

Castets P, Bertrand AT, Beuvin M, et al. Satellite cell loss and impaired muscle regeneration in selenoprotein N deficiency. *Hum Mol Genet.* 2011;20(4):694-704. doi:10.1093/hmg/ddq515

Castets P, Lescure A, Guicheney P, et al. Selenoprotein N in skeletal muscle: from diseases to function. *J Mol Med (Berl).* 2012;90(10):1095-107. doi: 10.1007/s00109-012-0896-x.

Cochain C, Vafadarnejad E, Arampatzi P, et al. Single-Cell RNA-Seq Reveals the Transcriptional Landscape and Heterogeneity of Aortic Macrophages in Murine Atherosclerosis. *Circ Res.* 2018;122(12):1661-1674. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.117.312509. Epub 2018 Mar 15.

Copeland PR, Driscoll DM. RNA binding proteins and selenocysteine. *Biofactors.* 2001;14(1-4):11-6. doi:10.1002/biof.5520140103

Chantry D, Romagnani P, Raport CJ, et al. Macrophage-derived chemokine is localized to thymic medullary epithelial cells and is a chemoattractant for CD3(+), CD4(+), CD8(low) thymocytes. *Blood.* 1999;94(6):1890-1898 <http://www.bloodjournal.org/content/94/6/1890>

Chantry D, DeMaggio AJ, Brammer H, et al. Profile of human macrophage transcripts: Insights into macrophage biology and identification of novel chemokines. *J Leukoc Biol.* 1998;64(1):49-54. doi:10.1002/jlb.64.1.49

Chawla A1, Nguyen KD, Goh YP. Macrophage-mediated inflammation in metabolic disease. *Nat Rev Immunol.* 2011;11(11):738-49. doi: 10.1038/nri3071

Chazaud B, Brigitte M, Yacoub-Youssef H, et al. Dual and beneficial roles of macrophages during skeletal muscle regeneration. *Exerc Sport Sci Rev.* 2009;37(1):18-22. doi: 10.1097/JES.0b013e318190ebdb

Chazaud B, Sonnet C, Lafuste P, et al. Satellite cells attract monocytes and use macrophages as a support to escape apoptosis and enhance muscle growth. *J Cell Biol.* 2003;163(5):1133-1143. doi:10.1083/jcb.200212046

Chazaud B. Macrophages: Supportive cells for tissue repair and regeneration. *Immunobiology.* 2014;219(3):172-178. doi:10.1016/j.imbio.2013.09.001

Chazaud B. Inflammation during skeletal muscle regeneration and tissue remodeling: application to exercise-induced muscle damage management. *Immunol Cell Biol.* 2016;94(2):140-5. doi: 10.1038/icb.2015.97

Chen XD, Zha ZP, Zhou JC, Lei XG. Evolution, regulation, and function of porcine selenome. *Free Radic Biol Med.* 2018;127:116-123 doi:10.1016/j.freeradbiomed.2018.04.560

Chevalier F, Arnaud D, Henault E, et al. A fine structural modification of glycosaminoglycans is correlated with the progression of muscle regeneration after ischaemia: towards a matrix-based therapy? *Eur Cell Mater.* 2015;30:51-68. doi:10.22203/eCM

Chizzolini C, Rezzonico R, De Luca C, et al. Th2 cell membrane Factors in Association with IL-4 enhance matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) while decreasing MMP-9 production by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-differentiated human monocytes. *J Immunol.* 2000;164(11):5952-5960. doi:10.4049/jimmunol.164.11.5952

Chung SS, Kim M, Youn BS, et al. Glutathione peroxidase 3 mediates the antioxidant effect of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in human skeletal muscle cells. *Mol Cell Biol.* 2009;29(1):20-30. doi:10.1128/MCB.00544-08

Christov C1, Chrétien F, Abou-Khalil R et al. Muscle satellite cells and endothelial cells: close neighbors and privileged partners. *Mol Biol Cell.* 2007 Apr;18(4):1397-409. doi:10.1091/mbc.E06-08-0693

Clausen J, Nielsen SA. Comparison of Whole Blood Selenium Values and Erythrocyte Glutathione Peroxidase Activities of Normal Individuals on Supplementation with and High Selenium Yeast. *Biol Trace Elem Res.* 1988;15:125-138. doi:10.1007/978-1-4612-4606-0_9

Clements M1, Gershenovich M1, Chaber C1, et al. Differential Ly6C Expression after Renal Ischemia-Reperfusion Identifies Unique Macrophage Populations. *J Am Soc Nephrol.* 2016;27(1):159-70. doi: 10.1681/ASN.2014111138

Colombier ML, Lafont J, Blanquaert F, et al. A single low dose of RGTA, a new healing agent, hastens wound maturation and enhances bone deposition in rat craniotomy defects. *Cells Tissues Organs.* 1999;164(3):131-40. doi:10.1159/000016651

Conrad M, Jakupoglu C, Moreno SG, et al. Essential Role for Mitochondrial Thioredoxin Reductase in Hematopoiesis, Heart Development, and Heart Function. *Mol Cell Biol.* 2004;24(21):9414-9423. doi:10.1128/mcb.24.21.9414-9423.2004

Dal-Secco D, Wang J, Zeng Z, et al. A dynamic spectrum of monocytes arising from the in situ reprogramming of CCR2+ monocytes at a site of sterile injury. *J Exp Med*. 2015;212(4):447-456. doi:10.1084/jem.20141539

Dallagi A, Girouard J, Hamelin-morrisette J, et al. The activating effect of IFN- c on monocytes / macrophages is regulated by the LIF – trophoblast – IL-10 axis via Stat1 inhibition and Stat3 activation. 2015;12(3):326-341. doi:10.1038/cmi.2014.50

Dalli J, Jones CP, Cavalcanti DM, et al. Annexin A1 regulates neutrophil clearance by macrophages in the mouse bone marrow. *Faseb J*. 2012;26(1):387-396. doi:10.1096/fj.11-182089

Dell'Orso S, Juan AH, Ko KD, et al. Single cell analysis of adult mouse skeletal muscle stem cells in homeostatic and regenerative conditions. *Development*. 2019;146(12). pii: dev174177. doi:10.1242 / dev.174177

Dentice M, Marsili A, Ambrosio R, et al. The FoxO3/type 2 deiodinase pathway is required for normal mouse myogenesis and muscle regeneration. *J Clin Invest*. 2010;120(11):4021-30. doi:10.1172/JCI43670

Desgeorges T, Liot S, Lyon S, et al. Open-CSAM, a new tool for semi-automated analysis of myofiber cross-sectional area in regenerating adult skeletal muscle. *Skelet Muscle*. 2019;9(1):2. doi:10.1186/s13395-018-0186-6

Desgeorges T, Caratti G, Mounier R et al. Glucocorticoids Shape Macrophage Phenotype for Tissue Repair. *Front Immunol*. 2019;10:1591. doi:10.3389/fimmu.2019.01591

Dierick H1, Bejsovec A. 5 Cellular mechanisms of wingless/Wnt signal transduction. *Curr Top Dev Biol*. 1999;43:153-90. doi:10.1016/S0070-2153(08)60381-6

Dilworth GL. Properties of the selenium-containing moiety of nicotinic acid hydroxylase from *Clostridium barkeri*. *Arch Biochem Biophys*. 1982;219(1):30-38. doi:10.1016/0003-9861(82)90130-8

Dincer Y, Erzin Y, Himmetoglu S, et al. Oxidative DNA damage and antioxidant activity in patients with inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci*. 2007;52(7):1636-1641. doi:10.1007/s10620-006-9386-8

Doble BW, Woodgett JR. GSK-3: tricks of the trade for a multi-tasking kinase. *J Cell Sci*. 2003 Apr 1;116(7):1175-86. doi: 10.1242 / jcs.00384

Donadio JLS, Rogero MM, Cockell S, et al. Influence of Genetic Variations in Selenoprotein Genes on the Pattern of Gene Expression after Supplementation with Brazil Nuts. *Nutrients*. 2017; 9(7): 739. doi:10.3390/nu9070739

Du J, Guan T, Zhang H, et al. Inhibitory crosstalk between ERK and AMPK in the growth and proliferation of cardiac fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008;368:402-407. doi:10.1016/j.bbrc.2008.01.099

Dumont N, Bouchard P, Frenette J. Neutrophil-induced skeletal muscle damage: a calculated and controlled response following hindlimb unloading and reloading. *Am J Physiol Integr Comp Physiol*. 2008;295(6):1831-1838. doi:10.1152/ajpregu.90318.2008

Dumont N, Frenette J. Macrophages protect against muscle atrophy and promote muscle recovery in vivo and in vitro: A mechanism partly dependent on the insulin-like growth factor-1 signaling molecule. *Am J Pathol*. 2010;176(5):2228-2235. doi:10.2353/ajpath.2010.090884

Dumont NA, Wang YX, Von Maltzahn J, et al. Dystrophin expression in muscle stem cells regulates their polarity and asymmetric division. *Nat Med*. 2015;21(12):1455-1463. doi:10.1038/nm.3990

Egerman MA, Glass DJ. Signaling pathways controlling skeletal muscle mass. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 2014;49(1):59-68. doi: 10.3109/10409238.2013.857291.

Eisenberg BR. Quantitative ultrastructure of mammalian skeletal muscle. *Comprehensiv Physiology*. 1983;73-112. doi:10.1002/cphy.cp100103

Erbay E, Chen J. The mammalian target of rapamycin regulates C2C12 myogenesis via a kinase-independent mechanism. *J Biol Chem*. 2001;276(39):36079-82. doi: 10.1074/jbc.C100406200

Escartin Q, Lallam-Laroye C, Baroukh B, et al. A new approach to treat tissue destruction in periodontitis with chemically modified dextran polymers. *FASEB J*. 2003;17(6):644-51. doi:10.1096/fj.02-0708com

Feige P, Brun CE, Ritso M, et al. Orienting Muscle Stem Cells for Regeneration in Homeostasis, Aging, and Disease. *Cell Stem Cell*. 2018;23(5):653-664. doi:10.1016/j.stem.2018.10.006

Finkel T. Signal transduction by reactive oxygen species. *J Cell Biol*. 2011;194(1)7-15. doi:10.1083/jcb.201102095

Finn AV, Nakano M, Polavarapu R et al. Hemoglobin directs macrophage differentiation and prevents foam cell formation in human atherosclerotic plaques. *J Am Coll Cardiol*. 2012;59(2):166-77. doi:10.1016/j.jacc.2011.10.852

Forman HJ, Torres M. Redox signaling in macrophages. *Mol Aspects Med*. 2001;22(4-5):189-216. doi:10.1016/S0098-2997(01)00010-3

Fredericks GJ, Hoffmann FW, Rose AH, et al. Stable expression and function of the inositol 1,4,5-triphosphate receptor requires palmitoylation by a DHHC6/selenoprotein K complex. *Proc Natl Acad Sci*. 2014;111(46):16478-16483. doi:10.1073/pnas.1417176111

Freedman JE, Welch GN, Loscalzo J, et al. Glutathione peroxidase potentiates the inhibition of platelet function by S-nitrosothiols. *J Clin Invest*. 1995;96(1):394-400. doi:10.1172/JCI118047

Fujiwara N1, Kobayashi K. Macrophages in inflammation. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*. 2005;4(3):281-286. doi:10.2174/1568010054022024

Fumagalli S, Perego C, Pischiutta F, et al. The ischemic environment drives microglia and macrophage function. *Front Neurol.* 2015;6:81. doi:10.3389/fneur.2015.00081. eCollection 2015.

Fukuzumi M, Shinomiya H, Shimizu Y, Ohishi K, Utsumi S. Endotoxin-induced enhancement of glucose influx into murine peritoneal macrophages via GLUT 1. *Infect Immun.* 1996;64(1):108-112. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8557327>

Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, et al. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest.* 2004;114(12):1752-1761. doi:10.1172/JCI200421625.1752

Gao C, Chen G, Romero G, et al. Induction of Gsk3 β - β -TrCP interaction is required for late phase stabilization of β -catenin in canonical Wnt signaling. *J Biol Chem.* 2014;289(10):7099-108. doi: 10.1074/jbc.M113.532606.

Galván-Peña S1, O'Neill LA. Metabolic reprogramming in macrophage polarization. *Front Immunol.* 2014 Sep 2;5:420. doi:10.3389/fimmu.2014.00420

Garcia-Filipe S, Barbier-Chassefiere V, Alexakis C, et al. RGTA OTR4120, a heparan sulfate mimetic, is a possible long-term active agent to heal burned skin. *J Biomed Mater Res A.* 2007;80(1):75-84. doi.org/10.1002/jbm.a.30874

Ge Y1, Wu AL, Warnes C, et al. mTOR regulates skeletal muscle regeneration in vivo through kinase-dependent and kinase-independent mechanisms. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2009;297(6):1434-1444. doi:10.1152/ajpcell.00248.2009

Gladyshev VN, Jeang KT, Stadtman TC. Selenocysteine, identified as the penultimate C-terminal residue in human T-cell thioredoxin reductase, corresponds to TGA in the human placental gene. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996;93(12):6146-51. doi:10.1073/pnas.93.12.6146

Glass CK, Ogawa S. Combinatorial roles of nuclear receptors in inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol.* 2006;6(1):44-55. doi:10.1038/nri1748

Glass CK, Saijo K. Nuclear receptor transrepression pathways that regulate inflammation in macrophages and T cells. *Nat Rev Immunol.* 2010;10(5):365-376. doi:10.1038/nri2748

Glass CK, Natoli G. Molecular control of activation and priming in macrophages. *Nat Immunol.* 2016;17(1):26-33. doi:10.1038/ni.3306

Gleissner CA, Shaked I, Little KM, et al. CXC Chemokine Ligand 4 Induces a Unique Transcriptome in Monocyte-Derived Macrophages. *J Immunol.* 2010;184(9):4810-4818. doi:10.4049/jimmunol.0901368

Gleissner CA. Macrophage phenotype modulation by CXCL4 in atherosclerosis. *Front Physiol.* 2012;3:1-7. doi:10.3389/fphys.2012.00001

Godiska R, Chantry D, Raport CJ, et al. Human macrophage-derived chemokine (MDC), a novel chemoattractant for monocytes, monocyte-derived dendritic cells, and natural killer cells. *J Exp Med*. 1997;185(9):1595-604. DOI:10.1084/jem.185.9.1595

Gondin J, Théret M, Duhamel G, et al. Myeloid HIFs are dispensable for resolution of inflammation during skeletal muscle regeneration. *J Immunol*. 2015;194(7):3389-99. doi:10.4049/jimmunol.1401420

Gonzalo JA, Pan Y, Lloyd CM, et al. Mouse monocyte-derived chemokine is involved in airway hyperreactivity and lung inflammation. *J Immunol*. 1999;163(1):403-411. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10384142>

Gosselin D, Link V, Romanoski CE, et al. Environment drives selection and function of enhancers controlling tissue-specific macrophage identities. *Cell*. 2014;159(6):1327-1340. doi:10.1016/j.cell.2014.11.023

Gratchev A, Guillot P, Hakiy N, et al. Alternatively activated macrophages differentially express fibronectin and its splice variants and the extracellular matrix protein β IG-H3. *Scand J Immunol*. 2001;53(4):386-392. doi:10.1046/j.1365-3083.2001.00885.x

Grond-ginsbach C, Lichy C, Padovani A, et al. GPx-3 Gene Promoter Variation and the Risk. *Stroke*. 2007;38(6):479444. doi:10.1161/STROKEAHA.106.479444

Gutiérrez J, Arce V, Brenes F, Chaves F. Changes in myofibrillar components after skeletal muscle necrosis induced by a myotoxin isolated from the venom of the snake *Bothrops asper*. *Exp Mol Pathol*. 1990;52(1):25-36. doi:10.1016/0014-4800(90)90055-I

Haddad M El, Jean E, Turki A, Vernus B, Bonniou A. Glutathione peroxidase 3 , a new retinoid target gene, is crucial for human skeletal muscle precursor cell survival. *J Cell Sci*. 2012;6147-6156. doi:10.1242/jcs.115220

Hafeman DG, Sunde RA, Hoekstra WG. Effect of dietary selenium on erythrocyte and liver glutathione peroxidase in the rat. *J Nutr* 1974;104:580-7. doi:10.1093/jn/104.5.580

Haldar M, Kohyama M, So AY, et al. Heme-Mediated SPI-C Induction Promotes Monocyte Differentiation into Iron-Recycling Macrophages. *Cell*. 2014;156(6):1223-1234. doi:10.1016/j.cell.2014.01.069

Halliwell B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol*. 2006;141(2):312-22. doi:10.1104/pp.106.077073

Han HQ, Zhou X, Mitch WE, et al. Myostatin/activin pathway antagonism: Molecular basis and therapeutic potential. *Int J Biochem Cell Biol*. 2013;45(10):2333-2347. doi:10.1016/j.biocel.2013.05.019

Han SJ, Lee BC, Yim SH, et al. Characterization of mammalian selenoprotein O: A redox-active mitochondrial protein. *PLoS One*. 2014;9(4):95518. doi:10.1371/journal.pone.0095518

Han, J. & Wang, Y. mTORC1 signaling in hepatic lipid metabolism. *Protein Cell*. 2018;9(2):145-151. doi:10.1007/s13238-017-0409-3

Haq S, Michael A, Andreucci M, et al. Stabilization of beta-catenin by a Wnt-independent mechanism regulates cardiomyocyte growth. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003;100(8):4610-5. doi:10.1073/pnas.0835895100

Hard GC. Some biochemical aspects of the immune macrophage. *Br J Exp Pathol*. 1970;51(1):97-105. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5434449>

Hatfield DL, Gladyshev VN. How selenium has altered our understanding of the genetic code. *Mol Cell Biol*. 2002;22(11):3565-76. doi:10.1128 / MCB.22.11.3565-3576.2002

Hatfield DL, Schweizer U, Tsuji PA et al. Selenium: Its molecular biology and role in human health. *Springer*; Fourth Edition, 2016. doi:10.1007/978-3-319-41283-2

Hill KE, Zhou J, McMahan WJ, et al. Deletion of selenoprotein P alters distribution of selenium in the mouse. *J Biol Chem*. 2003;278(16):13640-13646. doi:10.1074/jbc.M300755200

Hill KE, Zhou J, Austin LM, et al. The selenium-rich C-terminal domain of mouse selenoprotein p is necessary for the supply of selenium to brain and testis but not for the maintenance of whole body selenium. *J Biol Chem*. 2007;282(15):10972-10980. doi:10.1074 / jbc.M700436200

Hochreiter-hufford A, Ravichandran KS. Clearing the Dead : Apoptotic Cell Sensing, recognition, engulfment and digestion. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2013;5(1):008748. doi:10.1101/cshperspect.a008748

Horn A, Vandermeulen JH, Defour A, et al. Mitochondrial redox signaling enables repair of injured skeletal muscle cells. *Cell Biol*. 2017;10(495):1-24. doi:10.1126/scisignal.aaj1978

Houstis N, Rosen ED, Lander ES. Reactive oxygen species have a causal role in multiple forms of insulin resistance. *Nature*. 2006;440(7086):944-948. doi:10.1038/nature04634

Huang JQ, Li DL, Zhao H, et al. The selenium deficiency disease exudative diathesis in chicks is associated with downregulation of seven common selenoprotein genes in liver and muscle. *J Nutr*. 2011;141:1605–10. doi:10.3945/jn.111.145722

Huang JQ, Ren FZ, Jiang YY, et al. Selenoproteins protect against avian nutritional muscular dystrophy by metabolizing peroxides and regulating redox/apoptotic signaling. *Free Radic Biol Med*. 2015;83:129–38. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2015.01.033

Huang JQ, Zhou JC, Wu YY, et al. Roles of glutathione peroxidase 1 in glucose and lipid metabolism. *Free Radic Biol Med*. 2018;127:108-115. doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.05.077.

Imai T, Chantry D, Raport CJ, et al. Macrophage-derived chemokine is a functional ligand for the CC chemokine receptor 4. *J Biol Chem.* 1998;273(3):1764-8. doi:10.1074/jbc.273.3.1764

Imai T, Nagira M, Takagi S, et al. Selective recruitment of CCR4-bearing Th2 cells toward antigen-presenting cells by the CC chemokines thymus and activation-regulated chemokine and macrophage-derived chemokine. *Int Immunol.* 1999;11(1):81-8. doi:10.1093/intimm/11.1.81

Ishikura K, Misu H, Kumazaki M, et al. Selenoprotein P as a diabetes-associated hepatokine that impairs angiogenesis by inducing VEGF resistance in vascular endothelial cells. *Diabetologia.* 2014;57(9):1968-1976. doi:10.1007/s00125-014-3306-9

Jacquet-Guibon S, Dupays AG, Coudry V, et al. Randomized controlled trial demonstrates the benefit of RGTA® based matrix therapy to treat tendinopathies in racing horses. *PLoS One.* 2018;13(3):e0191796. doi:10.1371/journal.pone.0191796.

Jaitin DA, Adlung L, Thaïss CA, et al. Lipid-Associated Macrophages Control Metabolic Homeostasis in a Trem2-Dependent Manner. *Cell.* 2019;178(3):686-698. doi:10.1016/j.cell.2019.05.054

Jakupoglu C, Przemeczek GKH, Schneider M, et al. Cytoplasmic Thioredoxin Reductase Is Essential for Embryogenesis but Dispensable for Cardiac Development. *Mol Cell Biol.* 2005;25(5):1980-1988. doi:10.1128/mcb.25.5.1980-1988.2005

Jin RC, Mahoney CE, Coleman Anderson L, et al. Glutathione peroxidase-3 deficiency promotes platelet-dependent thrombosis in vivo. *Circulation.* 2011;123(18):1963-73. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.110.000034.

Jha AK, Huang SC, Sergushichev A, et al. Network integration of parallel metabolic and transcriptional data reveals metabolic modules that regulate macrophage polarization. *Immunity.* 2015;42(3):419-30. doi:10.1016/j.immuni.2015.02.005

Johnson-Léger C, Aurrand-Lions M, Imhof B et al. The parting of the endothelium: miracle, or simply a junctional affair? *J Cell Sci.* 2000;113(6):921-933. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10683141>

Jensen JI, Brørs O, Dahl HA. Different beta-adrenergic receptor density in different rat skeletal muscle fibre types. *Pharmacol Toxicol.* 1995;76(6):380-385. doi:10.1111/j.1600-0773.1995.tb00166.x

Juban G, Chazaud B. Metabolic regulation of macrophages during tissue repair: insights from skeletal muscle regeneration. *FEBS Lett.* 2017;591(19):3007-3021. doi:10.1002/1873-3468.12703

Juban G, Saclier M, Yacoub-Youssef H et al. AMPK Activation Regulates LTBP4-Dependent TGF-β1 Secretion by Pro-inflammatory Macrophages and Controls Fibrosis in Duchenne Muscular Dystrophy. *Cell Rep.* 2018;25(8):2163-2176 doi:10.1016/j.celrep.2018.10.077.

Juryneec MJ, Xia R, Mackrill JJ, et al. Selenoprotein N is required for ryanodine receptor calcium release channel activity in human and zebrafish muscle. *Proc Natl Acad Sci*. 2008;105(34):12485-12490. doi:10.1073/pnas.0806015105

Kadl A, Meher AK, Sharma PR. Identification of a novel macrophage phenotype that develops in response to atherogenic phospholipids via Nrf2. *Circ Res*. 2010;107(6):737-46. doi:10.1161/CIRCRESAHA.109.215715

Kang K, Park SH, Chen J, et al. Interferon- γ Represses M2 Gene Expression in Human Macrophages by Disassembling Enhancers Bound by the Transcription Factor MAF. *Immunity*. 2017;47(2):235-250.e4. doi:10.1016/j.immuni.2017.07.017

Kang UG, Seo MS, Roh MS, et al. The effects of clozapine on the GSK-3-mediated signaling pathway. *FEBS Lett*. 2004;560(1-3):115-9. doi:10.1016/S0014-5793(04)00082-1

Kawai M, Shoji Y, Onuma S, et al. Thyroid hormone status in patients with severe selenium deficiency. *Clin Pediatr Endocrinol*. 2018;27(2):67-74. doi:10.1297/cpe.27.67

Kurokawa S, Eriksson S, Rose KL, et al. Sepp1(UF) forms are N-terminal selenoprotein P truncations that have peroxidase activity when coupled with thioredoxin reductase-1. *Free Radic Biol Med*. 2014;69:67-76. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2014.01.010

Kurokawa S, Hill KE, McDonald WH, et al. Long isoform mouse selenoprotein P (Sepp1) supplies rat myoblast L8 cells with selenium via endocytosis mediated by heparin binding properties and apolipoprotein E receptor-2 (ApoER2). *J Biol Chem*. 2012;287(34):28717-26. doi:10.1074/jbc.M112.383521

Krieger-Brauer HI, Kather H. Human fat cells possess a plasma membrane-bound H₂O₂-generating system that is activated by insulin via a mechanism bypassing the receptor kinase. *J Clin Invest*. 1992;89(3):1006-13. doi:10.1172/JCI115641

Kryukov G V., Kryukov VM, Gladyshev VN. New mammalian selenocysteine-containing proteins identified with an algorithm that searches for selenocysteine insertion sequence elements. *J Biol Chem*. 1999;274(48):33888-33897. doi:10.1074/jbc.274.48.33888

Kryukov GV, Castellano S, Novoselov SV, et al. Characterization of mammalian selenoproteomes. *Science*. 2003;300(5624):1439-43. doi:10.1126/science.1083516

Kuang S, Rudnicki MA. The emerging biology of satellite cells and their therapeutic potential. *Trends Mol Med*. 2008;14(2):82-91. doi:10.1016/j.molmed.2007.12.004

Kwak GH, Choi SH, Kim HY. Dimethyl sulfoxide elevates hydrogen peroxide-mediated cell death in *Saccharomyces cerevisiae* by inhibiting the antioxidant function of methionine sulfoxide reductase A. *BMB Rep*. 2010;43(9):622-8. doi:10.5483/BMBRep.2010.43.9.622.

Lafont J, Blanquaert F, Colombier ML, et al. Kinetic study of early regenerative effects of RGTA11, a heparan sulfate mimetic, in rat craniotomy defects. *Calcif Tissue Int*. 2004;75(6):517-25. doi:10.1007/s00223-004-0012-5

Lassègue B, Griendling KK. NADPH oxidases: Functions and pathologies in the vasculature. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009;30(4):653-661. doi:10.1161/ATVBAHA.108.181610

Latroche C, Weiss-Gayet M, Muller L, et al. Coupling between Myogenesis and Angiogenesis during Skeletal Muscle Regeneration Is Stimulated by Restorative Macrophages. *Stem Cell Reports.* 2017;9(6):2018-2033. doi: 10.1016/j.stemcr.2017.10.027.

Le Grand F, Jones AE, Seale V, et al. Wnt7a activates the planar cell polarity pathway to drive the symmetric expansion of satellite stem cells. *Cell Stem Cell.* 2009;4(6):535-47. doi: 10.1016/j.stem.2009.03.013

Lee JH, Park KJ, Jang JK, et al. Selenoprotein S-dependent Selenoprotein K Binding to p97(VCP) Protein Is Essential for Endoplasmic Reticulum-associated Degradation. *J Biol Chem.* 2015;290(50):29941-52. doi: 10.1074/jbc.M115.680215.

Le Moal E, Pialoux V, Juban G, et al. Redox Control of Skeletal Muscle Regeneration. *Antioxid Redox Signal.* 2017;27(5):276-310. doi:10.1089/ars.2016.6782

Le Moal E, Juban G, Bernard AS, et al. Macrophage-derived superoxide production and antioxidant response following skeletal muscle injury. *Free Radic Biol Med.* 2018;120:33-40. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2018.02.024

Lei XG, Zhu JH, Cheng WH, et al. Paradoxical Roles of Antioxidant Enzymes: Basic Mechanisms and Health Implications. *Physiol Rev.* 2016;96(1):307-64. doi: 10.1152/physrev.00010.2014.

Li S, Gao F, Huang JQ, Wu YY, et al. Regulation and function of avian selenome. *Biochim Biophys Acta Gen Subj.* 2018;18:30091-6. doi.org/10.1016/j.bbagen.2018.03.029

Lieber R, Frieden J. Functional and clinical significance of skeletal muscle architecture. *Muscle and nerve.* 2000; 23:1647-1666. doi:10.1002/1097-4598(200011)23:11<1647::AID-MUS1>3.0.CO;2-M

Liu J, Zhang Z, Rozovsky S, et al. Selenoprotein K form an intermolecular diselenide bond with unusually high redox potential. *FEBS Lett.* 2014;588(18):3311-21. doi: 10.1016/j.febslet.2014.07.037.

Liu K, Zhao C, Chen J, et al. Overexpression of SEPP1 inhibits the proliferation and induces cell cycle G2/M arrest of 786-O and 769-P human renal carcinoma cells. *J Cell Mol Biol.* 2016;32(6):764-9. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27371843>

Loke P, Nair MG, Parkinson J, et al. IL-4 dependent alternatively-activated macrophages have a distinctive in vivo gene expression phenotype. *BMC Immunol.* 2002;3:7. doi:10.1186/1471-2172-3-7

Lu H, Huang D, Saederup N, et al. Macrophages recruited via CCR2 produce insulin-like growth factor-1 to repair acute skeletal muscle injury. *FASEB J.* 2010;25(1):358-369. doi:10.1096/fj.10-171579

McWhorter F, Wang T, et al. Modulation of macrophage phenotype by cell shape. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2013;110(43):17253-17258. doi:10.1073/pnas.1308887110

Marsili A, Ramadan W, Harney JW, et al. Type 2 iodothyronine deiodinase levels are higher in slow-twitch than fast-twitch mouse skeletal muscle and are increased in hypothyroidism. *Endocrinology*. 2010;151(12):5952-60. doi: 10.1210/en.2010-0631

Mantovani A, Sica A, Sozzani S, et al. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol*. 2004;25(12):677-686. doi:10.1016/j.it.2004.09.015

Martin-Romero FJ, Kryukov G V., Lobanov A V., et al. Selenium Metabolism in *Drosophila*. *J Biol Chem*. 2001;276(32):29798-29804. doi:10.1074/jbc.m100422200

Martin B, Curie M, Legrand P, et al. Natural alkylglycerols restrain growth and metastasis of grafted tumors in mice. *Nutr Cancer*. 2004;48(1):64-69. doi:10.1207/s15327914nc4801

Martin JF, Miano JM, Hustad CM, et al. A Mef2 gene that generates a muscle-specific isoform via alternative mRNA splicing. *Mol Cell Biol*. 1994;14(3):1647-1656. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8114702>

Martinez CO, McHale MJ, Wells JT, et al. Regulation of skeletal muscle regeneration by CCR2-activating chemokines is directly related to macrophage recruitment. *Am J Physiol Integr Comp Physiol*. 2010;299(3):832-842. doi:10.1152/ajpregu.00797.2009

Martinez FO, Gordon S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Rep*. 2014;6:13. doi:10.12703/P6-13

Martinez FO, Sica A, Mantovani A, et al. Macrophage activation and polarization. *Front Bioscience*. 2008;13(4):453-461. doi:10.2741/2692

Matthews VB, Åström MB, Chan MHS, et al. Brain-derived neurotrophic factor is produced by skeletal muscle cells in response to contraction and enhances fat oxidation via activation of AMP-activated protein kinase. *Diabetologia*. 2009;52(7):1409-1418. doi:10.1007/s00125-009-1364-1

Méplan C, Crosley LK, Nicol F, et al. Genetic polymorphisms in the human selenoprotein P gene determine the response of selenoprotein markers to selenium supplementation in a gender-specific manner (the SELGEN study). *FASEB J*. 2007;21(12):3063-74. <https://doi.org/10.1096/fj.07-8166com>

Mcarthur S, Gobbetti T, Juban G, Desgeorges T, Theret M. Annexin A1 drives macrophage skewing towards a resolving phenotype to accelerate the regeneration of muscle injury through AMPK activation. bioRxiv. 2019;375709. doi:10.1101/375709

McCann JC, Ames BN. Adaptive dysfunction of selenoproteins from the perspective of the triage theory: why modest selenium deficiency may increase risk of diseases of aging. *FASEB J* 2011;25: 1793–814. doi:10.1096/fj.11-180885

McCoy KEM, Weswig PH. Some selenium responses in the rat not related to vitamin E. *J Nutr* 1969;98:383–9. doi:10.1093/jn /98.4.383

Mcwhorter FY, Wang T, Nguyen P, et al. Modulation of macrophage phenotype by cell shape. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2013;110(43):17253-17258. doi:10.1073/pnas.1308887110

Meddahi A, Brée F, Papy-Garcia D, et al. Pharmacological studies of RGTA(11), a heparan sulfate mimetic polymer, efficient on muscle regeneration. *J Biomed Mater Res*. 2002;62(4):525-31. doi:10.1002/jbm.10283

Meiser J, Krämer L, Sapcariu SC, et al. Pro-inflammatory macrophages sustain pyruvate oxidation through pyruvate dehydrogenase for the synthesis of itaconate and to enable cytokine expression. *J Biol Chem*. 2016;291(8):3932-3946. doi:10.1074/jbc.M115.676817

Merry TL, Tran M, Dodd GT, et al. Hepatocyte glutathione peroxidase-1 deficiency improves hepatic glucose metabolism and decreases steatohepatitis in mice. *Diabetologia*. 2016;2632-2644. doi:10.1007/s00125-016-4084-3

Michelucci A, Heurtaux T, Grandbarbe L. Characterization of the microglial phenotype under specific pro-inflammatory and anti-inflammatory conditions: Effects of oligomeric and fibrillar amyloid-beta. *J Neuroimmunol*. 2009 May 29;210(1-2):3-12. doi:10.1016/j.jneuroim.2009.02.003. Epub 2009 Mar 9.

Misu H, Takamura T, Takayama H, et al. A liver-derived secretory protein, selenoprotein P, causes insulin resistance. *Cell Metab*. 2010 Nov 3;12(5):483-95. doi:10.1016/j.cmet.2010.09.015.

Misu H, Takayama H, Saito Y, et al. Deficiency of the hepatokine selenoprotein P increases responsiveness to exercise in mice through upregulation of reactive oxygen species and AMP-activated protein kinase in muscle. *Nat Med*. 2017 Apr;23(4):508-516. doi:10.1038/nm.4295

Moon RT, Bowerman B, Boutros M, et al. The promise and perils of Wnt signaling through beta-catenin. *Science*. 2002;296(5573):1644-6. doi:10.1126/science.1071549

Morales-Alamo D, Calbet JAL. Free Radical Biology and Medicine AMPK signaling in skeletal muscle during exercise : Role of reactive oxygen and nitrogen species. *Free Radic Biol Med*. 2016;98:68-77. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2016.01.012

Mounier R, Lantier L, Leclerc J, et al. Important role for AMPK α 1 in limiting skeletal muscle cell hypertrophy. *FASEB J*. 2009;23(7):2264-2273. doi:10.1096/fj.08-119057

Mounier R, Theret M, Arnold L, et al. AMPK α 1 Regulates Macrophage Skewing at the Time of Resolution of Inflammation during Skeletal Muscle Regeneration. *Cell Metab*. 2013;18(2):251-264. doi:10.1016/j.cmet.2013.06.017

Muchamuel T, Menon S, Pisacane P, et al. IL-13 protects mice from lipopolysaccharide-induced lethal endotoxemia: correlation with down-modulation of TNF-alpha, IFN-gamma, and IL-12 production. *J Immunol*. 1997;158(6):2898-903. <https://www.jimmunol.org/content/158/6/2898.long>

Nahrendorf M, Pittet MJ, Swirski FK. Monocytes: protagonists of infarct inflammation and repair after myocardial infarction. *Circulation*. 2010;121(22):2437-45. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.109.916346.

Napier BA, Brubaker SW, Sweeney TE, et al. Complement pathway amplifies caspase-11-dependent cell death and endotoxin-induced sepsis severity. *J Exp Med*. 2016;213(11):2365-2382. doi:10.1084/jem.20160027

Niemand C, Nimmesgern A, Haan S, et al. Activation of STAT3 by IL-6 and IL-10 in Primary Human Macrophages Is Differentially Modulated by Suppressor of Cytokine Signaling 3. *J Immunol*. 2003;170(6):3263-3272. doi:10.4049/jimmunol.170.6.3263

Noh OJ, Park YH, Chung YW, et al. Transcriptional regulation of selenoprotein W by MyoD during early skeletal muscle differentiation. *J Biol Chem*. 2010;285(52):40496-40507. doi:10.1074/jbc.M110.152934

Novak A, Hsu SC, Leung-Hagesteijn C, et al. Cell adhesion and the integrin-linked kinase regulate the LEF-1 and beta-catenin signaling pathways. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998;95(8):4374-9. DOI:10.1073/pnas.95.8.4374

Novak ML, Timothy JK. Macrophage phenotypes during tissue repair. *J Leukoc Biol*. 2013; 93(6): 875–881. doi:10.1189/jlb.1012512

Ogawa S, Lozach J, Benner C, et al. Molecular Determinants of Crosstalk between Nuclear Receptors and Toll-like Receptors. *Cell*. 2005;122(5):707-721. doi:10.1016/j.cell.2005.06.029

Ohara Y, Peterson TE, Harrison DG. Hypercholesterolemia Increases Endothelial Superoxide Anion Production. *J Clin Invest*. 1993;91(6):2546-2551. doi:10.1172/JCI116491

Okabe Y, Medzhitov R. Tissue-specific signals control reversible program of localization and functional polarization of macrophages. *Cell*. 2014;157(4):832-44. doi:10.1016/j.cell.2014.04.016

Olson GE, Winfrey VP, Nagdas SK, et al. Apolipoprotein E receptor-2 (ApoER2) mediates selenium uptake from selenoprotein P by the mouse testis. *J Biol Chem*. 2007;282(16):12290-7.

Olson GE, Winfrey VP, Hill KE, et al. Megalin mediates selenoprotein P uptake by kidney proximal tubule epithelial cells. *J Biol Chem*. 2008;283(11):6854-60. doi:10.1074/jbc.M709945200

Olson GE, Whitin JC, Hill KE, et al. Extracellular glutathione peroxidase (Gpx3) binds specifically to basement membranes of mouse renal cortex tubule cells. *Am J Physiol Physiol*. 2010;298(5):1244-1253. doi:10.1152/ajprenal.00662.2009

Ottaviano FG, Tang SS, Handy DE, et al. Regulation of the extracellular antioxidant selenoprotein plasma glutathione peroxidase (GPx-3) in mammalian cells. *Mol Cell Biochem*. 2009 Jul;327(1-2):111-26. doi: 10.1007/s11010-009-0049-x

Pallafacchina G1, Calabria E, Serrano AL, et al. A protein kinase B-dependent and rapamycin-sensitive pathway controls skeletal muscle growth but not fiber type specification. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002;99(14):9213-8. doi:10.1073/pnas.142166599

Palsson-McDermott EM, Curtis AM, Goel G, et al. Pyruvate kinase M2 regulates Hif-1 α activity and IL-1 β induction and is a critical determinant of the warburg effect in LPS-activated macrophages. *Cell Metab*. 2015;21(1):65-80. doi: 10.1016/j.cmet.2014.12.005

Palevski D, Levin-Kotler LP, Kain D, et al. Loss of Macrophage Wnt Secretion Improves Remodeling and Function After Myocardial Infarction in Mice. *J Am Heart Assoc*. 2017 Jan 6;6(1). doi: 10.1161/JAHA.116.004387

Panduro M, Benoist C, Mathis D. T reg cells limit IFN- γ production to control macrophage accrual and phenotype during skeletal muscle regeneration. *J Clin Invest*. 2018;115(11):2585-2593. doi:10.1073/pnas.1800618115

Pang P, Abbott M, Abdi M, et al. Pre-clinical model of severe glutathione peroxidase-3 deficiency and chronic kidney disease results in coronary artery thrombosis and depressed left ventricular function. *Nephrol Dial Transplant*. 2018;33(6):923-934. doi:10.1093/ndt/gfx304

Park-Min KH, Antoniv TT, Ivashkiv LB. Regulation of macrophage phenotype by long-term exposure to IL-10. *Immunobiology*. 2005;210(2-4):77-86. doi:10.1016/j.imbio.2005.05.002

Pascual G, Fong AL, Ogawa S, et al. A SUMOylation-dependent pathway mediates transrepression of inflammatory response genes by PPAR- γ . *Nature*. 2005;437:759-763. doi:10.1038/nature03988

Pellicoro A, Ramachandran P, Iredale JP, et al. Liver fibrosis and repair: immune regulation of wound healing in a solid organ. *Nat Rev Immunol*. 2014;14(3):181-94. doi: 10.1038/nri3623

Perdiguerro E, Sousa-victor P, Ruiz-bonilla V, et al. P38/MKP-1 regulated AKT coordinates macrophage transitions and resolution of inflammation during tissue repair. 2011;195(2):307-322. doi:10.1083/jcb.201104053

Pinsent J. The need for selenite and molybdate in the formation of formic dehydrogenase by members of the coli-aerogenes group of bacteria. *Biochem J*. 1954 May;57(1):10-6. doi: 10.1042/bj0570010

Pitts MW, Raman AV, Hashimoto AC, et al. Deletion of selenoprotein P results in impaired function of parvalbumin interneurons and alterations in fear learning and sensorimotor gating. *Neuroscience*. 2012;208:58-68. doi: 10.1016/j.neuroscience.2012.02.017

Porcheray F, Viaud S, Rimaniol AC, et al. Macrophage activation switching: An asset for the resolution of inflammation. *Clin Exp Immunol*. 2005;142(3):481-489. doi:10.1111/j.1365-2249.2005.02934.x

Purslow PP, Trotter JA. The morphology and mechanical properties of endomysium in series-fibred muscles : variations with muscle length. *J Muscle Res Cell Motil.* 1994;15(3): 299-308. doi:10.1007/BF00123482

Quinn ME, Goh Q, Kurosaka M, et al. Myomerger induces fusion of non-fusogenic cells and is required for skeletal muscle development. *Nat Commun.* 2017;8:15665. doi:10.1038/ncomms15665

Qiu Y, Nguyen KD, Odegaard JI, et al. Eosinophils and Type 2 Cytokine Signaling in Macrophages Orchestrate Development of Functional Beige Fat. *Cell.* 2014;157(6):1292-308. doi:10.1016/j.cell.2014.03.066

Rayman MP. Selenium and human health. *Lancet.* 2012;379(9822):1256-68. doi:10.1016/S0140-6736(11)61452-9

Relaix F1, Zammit PS. Satellite cells are essential for skeletal muscle regeneration: the cell on the edge returns centre stage. *Development.* 2012;139(16):2845-56. doi:10.1242/dev.069088

Ren X, Jemth P, Board PG, et al. A semisynthetic glutathione peroxidase with high catalytic efficiency : Selenogluthathione Transferase. *Chem Biol.* 2002;9(7):789-794. doi:10.1016/S1074-5521(02)00167-9

Reza MM, Subramaniam N, Sim CM, et al. Irisin is a pro-myogenic factor that induces skeletal muscle hypertrophy and rescues denervation-induced atrophy. *Nat Commun.* 2017;8(1):1-17. doi:10.1038/s41467-017-01131-0

Ramana CV, Grammatikakis N, Chernov M, et al. Regulation of c-myc expression by IFN-gamma through Stat1-dependent and -independent pathways. *EMBO J.* 2000;19(2):263-72. doi:10.1093/emboj/19.2.263

Ricardo SD, van Goor H, Eddy AA. Macrophage diversity in renal injury and repair. *J Clin Invest.* 2008;118(11):3522-30. doi: 10.1172/JCI36150

Rock C, Moos PJ. Selenoprotein P regulation by the glucocorticoid receptor. *Biometals.* 2009;22(6):995-1009. doi: 10.1007/s10534-009-9251-2.

Rogers NM, Ferenbach DA, Isenberg JS, et al. Dendritic cells and macrophages in the kidney: a spectrum of good and evil. *Nat Rev Nephrol.* 2014;10(11):625-43. doi:10.1038/nrneph.2014.170

Rommel C, Bodine SC, Clarke BA, et al. Mediation of IGF-1-induced skeletal myotube hypertrophy by PI(3)K/Akt/mTOR and PI(3)K/Akt/GSK3 pathways. *Nat Cell Biol.* 2001;3(11):1009-13. <https://www.nature.com/articles/ncb1101-1009>

Rosas M, Davies LC, Giles PJ, et al. The Transcription Factor Gata6 Links Tissue Macrophage Phenotype and Proliferative Renewal. *Science.* 2014;344(6184):645-649. doi:10.1126/science.1251414

Roskams T, Yang SQ, Koteish A, et al. Oxidative Stress and Oval Cell Accumulation in Mice and Humans with Alcoholic and Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Am J Pathol*. 2003;163(4):1301-11. doi: [10.1016/S0002-9440\(10\)63489-X](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)63489-X)

Rotruck JT, Pope AL, Ganther HE, et al. Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase. *Science*. 1973;179(4073):588-90.

Rowe GC1, Safdar A, Arany Z. Running forward: new frontiers in endurance exercise biology. *Circulation*. 2014;129(7):798-810. doi:[10.1161/CIRCULATIONAHA.113.001590](https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.113.001590)

Ruffell D, Mourkioti F, Gambardella A, et al. A CREB-C/EBP cascade induces M2 macrophage- specific gene expression and promotes muscle injury repair. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009;106(41):17475-80. doi:[10.1073/pnas.0908641106](https://doi.org/10.1073/pnas.0908641106)

Saclier M, Cuvellier S, Magnan M, et al. Monocyte/macrophage interactions with myogenic precursor cells during skeletal muscle regeneration. *FEBS J*. 2013;280(17):4118-4130. doi:[10.1111/febs.12166](https://doi.org/10.1111/febs.12166)

Sag D, Carling D, Stout RD, et al. Adenosine 5'-Monophosphate-Activated Protein Kinase Promotes Macrophage Polarization to an Anti-Inflammatory Functional Phenotype. *J Immunol*. 2008;181(12):8633-8641. doi:[10.4049/jimmunol.181.12.8633](https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.12.8633)

Saha B, Jyothi Prasanna S, Chandrasekar B, et al. Gene modulation and immunoregulatory roles of interferon gamma. *Cytokine*. 2010;50(1):1-14. doi:[10.1016/j.cyto.2009.11.021](https://doi.org/10.1016/j.cyto.2009.11.021)

Shtutman M, Zhurinsky J, Simcha I, et al. The cyclin D1 gene is a target of the beta-catenin/LEF-1 pathway. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999;96(10):5522-7. doi:[10.1073/pnas.96.10.5522](https://doi.org/10.1073/pnas.96.10.5522)

Salim T, Sershen CL, May EE. Investigating the role of TNF- α and IFN- γ activation on the dynamics of iNOS gene expression in lps stimulated macrophages. *PLoS One*. 2016;11(6). doi:[10.1371/journal.pone.0153289](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0153289)

Santos LR, Neves C, Melo M, et al. Selenium and Selenoproteins in Immune Mediated Thyroid Disorders. *Diagnostics*. 2018 Oct 4;8(4):70. doi: [10.3390/diagnostics8040070](https://doi.org/10.3390/diagnostics8040070)

Scannell M, Flanagan MB, Wynne KJ, et al. Annexin-1 and Peptide Derivatives Are Released by Apoptotic Cells and Stimulate Phagocytosis of Apoptotic by Neutrophils. *J Immunol*. 2007;178(7):4595-605. doi:[10.4049/jimmunol.178.7.4595](https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.7.4595)

Schiaffino S. Fibre types in skeletal muscle: A personal account. *Acta Physiol*. 2010;199(4):451-463. doi:[10.1111/j.1748-1716.2010.02130.x](https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.2010.02130.x)

Schoenmakers E, Hatfield D, Chatterjee K, et al. Mutation in human selenocysteine transfer RNA selectively disrupts selenoprotein synthesis. *J Clin Invest*. 2016;126(3):992-996. doi:[10.1172/JCI84747](https://doi.org/10.1172/JCI84747).ited

Schomburg L, Schweizer U, Holtmann B, et al. Gene disruption discloses role of selenoprotein P in selenium delivery to target tissues. *Biochem J*. 2003;370(2):397-402. doi:10.1042/bj20021853

Schomburg L. Selenium, selenoproteins and the thyroid gland: interactions in health and disease. *Nat Rev Endocrinol*. 2011 Oct 18;8(3):160-71. doi: 10.1038/nrendo.2011.174

Schwarz K, Foltz CM. Selenium as an integral part of factor 3 against dietary necrotic liver degeneration. *J Am Chem Soc* 1957;79:3292–3. doi:10.1016/S0899-9007(98)00183-X

Schwarz K, Bieri JG, Briggs GM, Scott ML. Prevention of exudative diathesis in chicks by factor 3 and selenium. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1957;95:621–5. doi:10.3181/00379727-95-23308

Seale LA, Gilman CL, Hashimoto AC, et al. Diet-Induced Obesity in the Selenocysteine Lyase Knockout Mouse. *Antioxid Redox Signal*. 2015;23(10):761-774. doi:10.1089/ars.2015.6277

Séguin CML. A comparison of differing modalities of exercise on the acute satellite cell responses in older adults. *Thesis McMaster University*, Dept. of Kinesiology, 2014;1-93. https://macsphere.mcmaster.ca/bitstream/11375/16423/1/Seguin.Christopher.MScThesis_FinalDraft.pdf

Seiler A, Schneider M, Förster H, et al. Glutathione peroxidase 4 senses and translates oxidative stress into 12/15-lipoxygenase dependent- and AIF-mediated cell death. *Cell Metab*. 2008;8(3):237-248. doi:10.1016/j.cmet.2008.07.005

Self WT, Stadtman TC. Selenium-dependent metabolism of purines: A selenium-dependent purine hydroxylase and xanthine dehydrogenase were purified from *Clostridium purinolyticum* and characterized. *Proc Natl Acad Sci*. 2000;97(13):7208-7213. doi:10.1073/pnas.97.13.7208

Shaul ME, Bennett G, Strissel KJ, et al. Dynamic, M2-like remodeling phenotypes of CD11c+ adipose tissue macrophages during high-fat diet-Induced obesity in mice. *Diabetes*. 2010;59(5):1171-1181. doi:10.2337/db09-1402

Shi J, Hua L, Harmer D. Cre Driver Mice Targeting Macrophages. *Methods Mol Biol*. 2018;1784:263-275. doi: 10.1007/978-1-4939-7837-3_24.

Shu L, Zhang X, Houghton PJ. Myogenic differentiation is dependent on both the kinase function and the N-terminal sequence of mammalian target of rapamycin. *J Biol Chem*. 2002;277(19):16726-32. doi:10.1074/jbc.M112285200

Soehnlein O, Lindbom L. Phagocyte partnership during the onset and resolution of inflammation. *Nat Rev Immunol*. 2010;10(6):427-439. doi:10.1038/nri2779

Solinas G, Schiarea S, Liguori M, et al. Tumor-Conditioned Macrophages Secrete Migration-Stimulating Factor: A New Marker for M2-Polarization, Influencing Tumor Cell Motility. *J Immunol*. 2010;185(1):642-652. doi:10.4049/jimmunol.1000413

Sowinska, Agnieszka. Following the white rabbit : release and regulation of HMGB1 in inflammation. 2019; Thesis, Dept of Medicine, Solna.
https://openarchive.ki.se/xmlui/bitstream/handle/10616/46636/Thesis_Agnieszka_%20Sowinska.pdf?sequence=3&isAllowed=y

Steinbrenner H. Free Radical Biology and Medicine Interference of selenium and selenoproteins with the insulin-regulated carbohydrate and lipid metabolism. *Free Radic Biol Med.* 2013;65:1538-1547. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2013.07.016

Steinbrenner H, Bilgic E, Alili L, et al. Selenoprotein P protects endothelial cells from oxidative damage by stimulation of glutathione peroxidase expression and activity. *Free Radic Res.* 2006;40(9):936-943. doi:10.1080/10715760600806248

Su D, Novoselov S V., Sun Q-A, et al. Mammalian Selenoprotein Thioredoxin-glutathione Reductase. *J Biol Chem.* 2005;280(28):26491-26498. doi:10.1074/jbc.m503638200

Sulahian TH, Högger P, Wahner AE, et al. Human monocytes express CD163, which is upregulated by IL-10 and identical to p155. *Cytokine.* 2000;12(9):1312-1321. doi:10.1006/cyto.2000.0720

Sun Q-A, Kirnarsky L, Sherman S, et al. Selenoprotein oxidoreductase with specificity for thioredoxin and glutathione systems. *Proc Natl Acad Sci.* 2001;98(7):3673-3678. doi:10.1073/pnas.051454398

Sun QA, Wu Y, Zappacosta F, et al. Redox regulation of cell signaling by selenocysteine in mammalian thioredoxin reductases. *J Biol Chem.* 1999;274(35):24522-24530. doi:10.1074/jbc.274.35.24522

Sunde RA, Li J-L, Taylor RM. Insights for setting of nutrient requirements, gleaned by comparison of selenium status biomarkers in turkeys and chickens versus rats, mice, and lambs. *Adv Nutr.* 2016;7:1129-38. doi:10.3945/an.116.012872

Suzuki A, Scruggs A, Iwata J. The temporal specific role of WNT/ β -catenin signaling during myogenesis. *J Nat Sci.* 2015;1(8):e143.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26176019>

Park SY, Lee YK, Kim HJ, Park OJ, Kim YM1. AMPK interacts with β -catenin in the regulation of hepatocellular carcinoma cell proliferation and survival with selenium treatment. *Oncol Rep.* 2016;35(3):1566-72. doi: 10.3892/or.2015.4519.

Rouet V, Hamma-Kourbali Y, Petit E, et al. A synthetic glycosaminoglycan mimetic binds vascular endothelial growth factor and modulates angiogenesis. *J Biol Chem.* 2005;280(38):32792-800. doi:10.1074/jbc.M504492200

Rouet V, Meddahi-Pellé A, Miao HQ, et al. Heparin-like synthetic polymers, named RGTAs, mimic biological effects of heparin in vitro. *J Biomed Mater Res A.* 2006;78(4):792-7. doi:10.1002/jbm.a.30723

Tacke F, Alvarez D, Kaplan TJ, et al. Monocyte subsets differentially employ CCR2, CCR5, and CX3CR1 to accumulate within atherosclerotic plaques. *J Clin Invest*. 2007;117(1):185-194. doi:10.1172/JCI28549.cal

Tang Z, Niven-Fairchild T, Tadesse S, et al. Glucocorticoids enhance CD163 expression in placental hofbauer cells. *Endocrinology*. 2013;154(1):471-482. doi:10.1210/en.2012-1575

Tannahill GM, Curtis AM, Adamik J, et al. Succinate is an inflammatory signal that induces IL-1 β through HIF-1 α . *Nature*. 2013;496(7444):238-242. doi:10.1038/nature11986

Taylor PR, Stacey M, Lin H, et al. Macrophage receptors and immune recognition. *Annu Rev Immunol*. 2005;7(23):901-944. doi:10.1146/annurev.immunol.23.021704.115816

Teixeira CF, Zamunér SR, Zuliani JP. Neutrophils do not contribute to local tissue damage, but play a key role in skeletal muscle regeneration, in mice injected with Bothrops asper snake venom. *Muscle Nerve*. 2003;28(4):449-59. doi:10.1002/mus.10453

Tidball JG, Berchenko E, Frenette J. Macrophage invasion does not contribute to muscle membrane injury during inflammation. *J Leukoc Biol*. 1999;65(4):492-498. doi:10.1002/jlb.65.4.492

Tidball JG. Interactions between muscle and the immune system during modified musculoskeletal loading. *Clin Orthop Relat Res*. 2002;(403 Suppl):100-109. doi:10.1097/00003086-200210001-00012

Tonkin J, Temmerman L, Sampson RD, et al. Monocyte/Macrophage-derived IGF-1 Orchestrates Murine Skeletal Muscle Regeneration and Modulates Autocrine Polarization. *Mol Ther*. 2015 Jul;23(7):1189-1200. doi: 10.1038/mt.2015.66

Töröcsik D, Bárdos H, Nagy L, et al. Identification of factor XIII-A as a marker of alternative macrophage activation. *Cell Mol Life Sci*. 2005;62(18):2132-2139. doi:10.1007/s00018-005-5242-9

Theret M, Mounier R, Rossi F. The origins and non-canonical functions of macrophages in development and regeneration. *Development*. 2019;146(9). doi: 10.1242/dev.156000

Tran TH, Rastogi R, Shelke J, et al. Modulation of Macrophage Functional Polarity towards Anti-Inflammatory Phenotype with Plasmid DNA Delivery in CD44 Targeting Hyaluronic Acid Nanoparticles. *Sci Rep*. 2015;5:1-15. doi:10.1038/srep16632

Traulsen H, Steinbrenner H, Buchczyk DP, et al. Selenoprotein P Protects Low-density Lipoprotein Against Oxidation. *Free Radic Res*. 2003;38(2):123-128. doi:10.1080/10715760320001634852

Trotter JA, Purslow PP. Functional morphology of the endomysium in series fibered muscles. *J Morphol*. 1992;212(2):109-122. doi:10.1002/jmor.1052120203

Tsukamoto S, Shibasaki A, Naka A, et al. Lactate Promotes Myoblast Differentiation and Myotube Hypertrophy via a Pathway Involving MyoD In Vitro and Enhances Muscle Regeneration In Vivo. *Int J Mol Sci*. 2018;19(11):3649. doi:10.3390/ijms19113649

Uhlenhaut NH, Barish GD, Yu RT, et al. Insights into Negative Regulation by the Glucocorticoid Receptor from Genome-wide Profiling of Inflammatory Cistromes. *Mol Cell*. 2013;49(1):158-171. doi:10.1016/j.molcel.2012.10.013

Ursini, Fulvio, Heim, et al. Dual function of the selenoprotein PHGPx during sperm maturation. *Science* 1999;285(5432):1393-1397. doi:10.1126/science.285.5432.1393

Van den Bossche J, Baardman J, Otto NA et al. Mitochondrial Dysfunction Prevents Repolarization of Inflammatory Macrophages. *Cell Rep*. 2016;17(3):684-696. doi:10.1016/j.celrep.2016.09.008.

Varga T, Mounier R, Gogolak P, et al. Tissue LyC6- macrophages are generated in the absence of circulating LyC6- monocytes and Nur77 in a model of muscle regeneration. *J Immunol*. 2013;191(11):5695-701. doi: 10.4049/jimmunol.1301445

Varga T, Mounier R, Horvath A, et al. Highly Dynamic Transcriptional Signature of Distinct Macrophage Subsets during Sterile Inflammation, Resolution, and Tissue Repair. *J Immunol*. 2016;196(11):4771-4782. doi:10.4049/jimmunol.1502490

Verma S, Hoffmann FW, Kumar M, et al. Selenoprotein K Knockout Mice Exhibit Deficient Calcium Flux in Immune Cells and Impaired Immune Responses. *J Immunol*. 2011;186(4):2127-2137. doi:10.4049/jimmunol.1002878

Vestergaard C, Yoneyama H, Murai M, et al. Overproduction of Th2-specific chemokines in NC/Nga mice exhibiting atopic dermatitis-like lesions. *J Clin Invest*. 1999;104(8):1097-1105. doi:10.1172/JCI7613

Viola A, Munari F, Sánchez-Rodríguez R et al. The Metabolic Signature of Macrophage Responses. *Front Immunol*. 2019;10:1462. doi:10.3389/fimmu.2019.01462

Vyas DR, Spangenburg EE, Abraha TW, et al. GSK-3beta negatively regulates skeletal myotube hypertrophy. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2002;283(2):C545-51. doi:10.1152/ajpcell.00049.2002

Voetsch B, Jin RC, Bierl C, et al. Promoter polymorphisms in the plasma glutathione peroxidase (GPx-3) gene: a novel risk factor for arterial ischemic stroke among young adults and children. *Stroke*. 2007;38(1):41-9. doi:10.1161/01.STR.0000252027.53766.2b

Voetsch B, Jin RC, Bierl C, et al. Role of promoter polymorphisms in the plasma glutathione peroxidase (GPx-3) gene as a risk factor for cerebral venous thrombosis. *Stroke*. 2008;39(2):303-307. doi:10.1161/STROKEAHA.107.490094

Walczak R, Carbon P, Krol A. An essential non-Watson-Crick base pair motif in 3'UTR to mediate selenoprotein translation. *RNA*. 1998;4(1):74-84. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1369598/>

Wang F, Zhang S, Jeon R, et al. Interferon Gamma Induces Reversible Metabolic Reprogramming of M1 Macrophages to Sustain Cell Viability and Pro-Inflammatory Activity. *EBioMedicine*. 2018;30:303-316. doi:10.1016/j.ebiom.2018.02.009

Wang Q, Ni H, Lan L, et al. Fra-1 protooncogene regulates IL-6 expression in macrophages and promotes the generation of M2d macrophages. *Cell Res.* 2010;20(6):701-712. doi:10.1038/cr.2010.52

Warren GL, Hulderman T, Mishra D, et al. Chemokine receptor CCR2 involvement in skeletal muscle regeneration. *FASEB J.* 2005;19(3):413-415. doi:10.1096/fj.04-2421fje

Witjas FMR, Van den Berg BM, Van den Berg CW et al. Concise Review: The Endothelial Cell Extracellular Matrix Regulates Tissue Homeostasis and Repair. *Stem Cells Transl Med.* 2019;8(4):375-382. doi: 10.1002/sctm.18-0155.

Wu Q, Yao HD, Zhang ZW, et al. Possible correlation between selenoprotein W and myogenic regulatory factors in chicken embryonic myoblasts. *Biol Trace Elem Res.* 2012;150(1-3):166-172. doi:10.1007/s12011-012-9520-8

Wurth L, Gribling-Burrer AS, Verheggen C, et al. Hypermethylated-capped selenoprotein mRNAs in mammals. *Nucleic Acids Res.* 2014;42(13):8663-77. doi: 10.1093/nar/gku580

Yang H, Youm YH, Vandanmagsar B, et al. Obesity accelerates thymic aging. *Blood.* 2009;114(18):3803-12. doi: 10.1182/blood-2009-03-213595

Yao H, Fan R, Zhao X, et al. Selenoprotein W redox-regulated Ca²⁺ channels correlate with selenium deficiency-induced muscles Ca²⁺ leak. *Oncotarget.* 2016;7(36):57618-57632. doi:10.18632/oncotarget.11459

Zerria K, Jerbi E, Hammami S, et al. Recombinant integrin CD11b A-domain blocks polymorphonuclear cells recruitment and protects against skeletal muscle inflammatory injury in the rat. *Immunology.* 2006;119(4):431-440. doi:10.1111/j.1365-2567.2006.02454.x

Zeyda M, Farmer D, Todoric J, et al. Human adipose tissue macrophages are of an anti-inflammatory phenotype but capable of excessive pro-inflammatory mediator production. *Int J Obes.* 2007;31(9):1420-1428. doi:10.1038/sj.ijo.0803632

Zhang C, Wang C, Li Y, et al. Complement C3a signaling facilitates skeletal muscle regeneration by regulating monocyte function and trafficking. *Nat Commun.* 2017;8(1):2078. doi:10.1038/s41467-017-01526-z

Zhang J, Wang X, Vikash V, et al. ROS and ROS-Mediated Cellular Signaling. *Oxid Med Cell Longev.* 2016;2016:4350965. doi:10.1155/2016/4350965

Zhang L, Dong Y, Dong Y, et al. Role of integrin-β3 protein in macrophage polarization and regeneration of injured muscle. *J Biol Chem.* 2012;287(9):6177-6186. doi:10.1074/jbc.M111.292649

Zhang L, Ran L, Garcia GE, et al. Chemokine CXCL16 regulates neutrophil and macrophage infiltration into injured muscle, promoting muscle regeneration. *Am J Pathol.* 2009;175(6):2518-2527. doi:10.2353/ajpath.2009.090275

Zhang S, Li F, Younes M, et al. Reduced selenium-binding protein 1 in breast cancer correlates with poor survival and resistance to the anti-proliferative effects of selenium. *PLoS One*. 2013;8(5):e63702. doi: [10.1371/journal.pone.0063702](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063702)

Zhang W, Behringer R, Olson EN. Inactivation of the myogenic bHLH gene MRF4 results in up regulation of myogenin and rib anomalies. *Genes Dev*. 1995;9:1388-1399. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7797078>

Zhang Y, Fomenko D, Gladyshev V. The microbial selenoproteome of the Sargasso Sea. *Genome Biol*. 2005;6(4):37. doi:[10.1186/gb-2005-6-4-r37](https://doi.org/10.1186/gb-2005-6-4-r37)

Zhang Y, Chen X. Reducing selenoprotein P expression suppresses adipocyte differentiation as a result of increased preadipocyte inflammation. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2011;300(1):77-85. doi:[10.1152/ajpendo.00380.2010](https://doi.org/10.1152/ajpendo.00380.2010)

Zhao H, Li K, Tang JY, et al. Expression of selenoprotein genes is affected by obesity of pigs fed a high-fat diet. *J Nutr*. 2015;145:1394–401. doi:[10.3945/jn.115.211318](https://doi.org/10.3945/jn.115.211318)

Zhao P, Hoffman EP. Embryonic Myogenesis Pathways in Muscle Regeneration. *Dev Dyn*. 2004;229(2):380-392. doi:[10.1002/dvdy.10457](https://doi.org/10.1002/dvdy.10457)

Zhao W, Lu H, Wang X, et al. CX3CR1 deficiency delays acute skeletal muscle injury repair by impairing macrophage functions. *FASEB J*. 2016;30(1):380-393. doi:[10.1096/fj.14-270090](https://doi.org/10.1096/fj.14-270090)

Zimowska M, Szczepankowska D, Streminska W, et al. Heparan sulfate mimetics modulate calpain activity during rat Soleus muscle regeneration. *J Cell Physiol*. 2001;188(2):178-87. doi:[10.1002/jcp.1106](https://doi.org/10.1002/jcp.1106)

Zimowska M, Constantin B, Papy-Garcia D, et al. Novel glycosaminoglycan mimetic (RGTA, RGD120) contributes to enhance skeletal muscle satellite cell fusion by increasing intracellular Ca²⁺ and calpain activity. *J Cell Physiol*. 2005;205(2):237-45. doi:[10.1002/jcp.20403](https://doi.org/10.1002/jcp.20403)

Zizzo G, Hilliard BA, Monestier M, et al. Efficient Clearance of Early Apoptotic Cells by Human Macrophages Requires M2c Polarization and MerTK Induction. *J Immunol*. 2012;189(7):3508-3520. doi:[10.4049/jimmunol.1200662](https://doi.org/10.4049/jimmunol.1200662)