



HAL
open science

Le microenvironnement cellulaire : un frein aux effets du réentraînement à l'effort chez le patient BPCO ?

Matthias Catteau

► To cite this version:

Matthias Catteau. Le microenvironnement cellulaire : un frein aux effets du réentraînement à l'effort chez le patient BPCO ?. Médecine humaine et pathologie. Université Montpellier, 2019. Français. NNT : 2019MONT4002 . tel-03507156

HAL Id: tel-03507156

<https://theses.hal.science/tel-03507156>

Submitted on 3 Jan 2022

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

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

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

En Physiologie

École doctorale Sciences du Mouvement Humain

Physiologie et Médecine Expérimentale du Cœur et des Muscles (PhyMedExp)
Unité de recherche INSERM U1046 - CNRS UMR 9214 – Université de Montpellier

Le microenvironnement cellulaire : Un frein aux effets bénéfiques du réentraînement à l'effort chez le patient BPCO ?

Présentée par Matthias CATTEAU
Le 10 décembre 2019

Sous la direction du Pr. Maurice HAYOT et Dr. Pascal POMIÈS

Devant le jury composé de

Esther BARREIRO, PU-PH, IMIM PRBB, Barcelone

Frédéric COSTES, PU-PH, INRA UMR1019, Clermont-Ferrant

Claudine FABRE, PU, EA7369 URePSSS, Lille

Anne BONNIEU, DR, DMEM INRA UMR0866, Montpellier

Maurice HAYOT, PU-PH, PhyMedExp INSERM CNRS UM, Montpellier

Pascal POMIÈS, CRCN, PhyMedExp INSERM CNRS UM, Montpellier

Rapporteuse

Rapporteur

Examinatrice

Examinatrice

Directeur de thèse

Co-Directeur de thèse



UNIVERSITÉ
DE MONTPELLIER

*La plupart de nos maladies
proviennent de notre nature corruptible et de notre ignorance.
mais toute consolation et toute guérison viennent de Dieu et de la Science.*

Monseigneur Joseph Dominique D'Inguibert

Remerciements

J'imagine que de nombreuses parties « remerciements » de thèse ont été entamées de la manière suivante « *Avant d'être une aventure scientifique, la thèse est une aventure humaine hors du commun...* ». Outre le fait que je pense que cette phrase est vraie, je pense également qu'il est nécessaire de continuer de le rappeler aux futures générations de femmes et d'hommes de Sciences qui décideront de se lancer dans ce périple. En effet, l'accomplissement d'un tel travail, aussi ardu et complexe, ne peut être accompli qu'avec l'aide d'une communauté bienveillante. J'ai la chance d'avoir pu travailler avec des gens qui appartiennent à cette communauté : « Voyager seul mais loin ou voyager à plusieurs mais longtemps ». Définitivement j'opte pour la seconde option.

Si cette partie apparaît comme l'une des plus personnelles, elle me semble également être l'une des plus difficiles. Il est probable que j'oublie certaines personnes et je m'en excuse par avance, mais si c'est le cas, je leur propose de me rappeler à l'ordre pour que je puisse leur témoigner mes remerciements de vive voix.

Je voudrais commencer par remercier les membres du jury qui ont accepté sans hésitation d'évaluer mon travail :

Au Professeure Esther Barreiro et au Professeur Frédéric Costes merci d'avoir pris de votre temps pour expertiser mon travail en tant que rapporteur.

Au Professeure Claudine Fabre merci d'avoir accepté de traverser la France pour examiner mon travail, et au Docteur Anne Bonnieu d'avoir suivi mon travail et ce depuis mon comité de suivi de thèse.

Je tiens à remercier le Professeur Jacques Mercier qui, au-delà de m'avoir accueilli dans son unité et son équipe, a été une personne à l'écoute et pour laquelle conserverai un profond respect.

Je tiens à remercier le Docteur Sylvain Richard qui co-dirigeait le laboratoire à mon arrivée et le Docteur Alain Lacampagne qui l'a récemment relayé à ce poste de co-directeur. Merci pour votre accueil et votre attention durant ces trois années.

Je remercie mes directeurs de thèse pour avoir été un duo d'encadrants rares :

Maurice, quelle belle opportunité que de te tutoyer volontairement pour la première lors de mes remerciements. Merci pour la confiance que tu as rapidement accordé à un étudiant que tu connaissais à peine. Merci de m'avoir toujours donné ces coups de fouet si spécifiques, qui m'ont permis de gravir des étapes importantes et qui sont toujours tombés au bon moment (comme durant les quelques jours qui ont précédé le concours... « NON, TU N'Y CROIS PAS, TU NE ME LE VENDS PAS ! MOI, JE SUIS DANS LES JURYS, JE NE TE CROIS PAS ! »). Mais également pour avoir toujours su trouver le moyen de voir le bon dans ce que je voyais de mauvais. MERCI !

Pascal, si notre première rencontre (au concours CBS2 en 2015) ne présageait pas de la collaboration que nous allions entamer un an plus tard, celle-ci était déjà sous le signe de la Science. J'ai l'impression que c'était hier que je t'entendais me dire : « tu sais 36 mois c'est très court, au début tu te dis que ça va, et à la fin tu te rends compte que non, et qu'il te faudrait plus de temps ». Une fois de plus, tu avais raison. Merci de m'avoir prodigué ton savoir-faire scientifique, mais également nautique, œnologique, en peinture murale et bien plus encore. Je n'oublierais pas cette première balade en paddle, ni ce verre de Puech-Haut bu avec le plus grand plaisir avec l'ensemble du groupe BPCO, chez toi et Virginie. Des souvenirs plein la tête que je n'hésiterais jamais à raconter à qui veut bien m'écouter. Merci pour ta bienveillance pendant ces trois années, à avoir partagé le même bureau de 6m², des idées, des projets, des joies, des déceptions mais également des gourmandises plus diabétogènes les unes que les autres. Merci d'avoir eu confiance en moi et d'avoir pensé que s'il y avait une chance sur mille pour que j'ai le concours, qu'il fallait la tenter. Avec le recul, je pense que la tâche de m'encadrer n'aura pas été simple, mais tes efforts auront porté leurs fruits...

TRIS : 121,14 g/mol, Vitamine C : 176,12 g/mol et NaCl : 58,44 g/mol 😊. MERCI !

Cette thèse c'est également pour moi l'occasion de remercier l'aide et le soutien de tout un groupe :

À Emilie, je suis très heureux d'avoir partagé avec toi ce bureau de 6m² avec Pascal. Merci d'avoir apporté cette touche féminine nécessaire à notre bureau. Merci pour ton aide et ton soutien au long de ces 3 années. Merci de m'avoir prodigué tes analyses sur le tennis, la Sicile mais également pour toutes les relectures que tu as pu faire avec Pascal (manuscrit, papiers, résumés...), vous n'avez pas réussi à améliorer ni mon français ni mon anglais, mais vous avez au moins réussi à le faire croire à ceux qui ont lu nos productions scientifiques.

A Farès, l'homme le plus hyperactif que j'ai eu le plus plaisir de connaître. Merci d'avoir toujours éveillé ma curiosité et de m'avoir transmis la passion et la rigueur de la méthodologie. Si j'ai bien retenu un enseignement de ta part, c'est qu'on peut faire beaucoup avec peu et de ne jamais rien lâcher. Merci d'avoir autant que possible essayé de te libérer pour venir faire un match du futsal. Même si tu n'as pas besoin de moi pour le savoir, je tiens à affirmer que la taille n'a rien avoir avec la grandeur d'un monsieur ! Merci Farès.

A Léo, mon comparse du groupe BPCO et des virées à l'École Doctorale, qui se sont toujours bien finies. Je peux désormais affirmer que tu n'as jamais cessé de me surprendre. Depuis le premier jour où j'ai fait ta connaissance, tu as forcé mon respect. Je pense sans nul doute que tu es l'étudiant le plus brillant que j'ai vu jusqu'à aujourd'hui, et je pense que quand ta soutenance viendra, tu t'en sortiras avec brio à l'image de ton parcours. De toute manière tu es entre de bonnes mains. Merci pour ton aide en statistique et de m'avoir fait progresser sur l'analyse critique de mes résultats. Merci d'avoir essayé de m'initier à l'escalade, bien que ça n'ait pas été un franc succès. Merci et bonne continuation.

A Bronia, tu m'as toujours ébloui de par tes tenues colorées et ton caractère tout aussi coloré, tu n'as jamais cessé de me donner le sourire. Et bien que tu m'aies considéré comme « un kéké bis », je suis très content d'avoir travaillé à ton contact. J'espère que nous aurons de nouvelles occasions d'interagir à l'avenir.

A François, Merci pour ton flegme Belge rafraichissant. Et même si je dois avouer que je n'ai pas toujours compris ce tu me disais, j'ai toujours apprécié ta sympathie, tant en soirée BPCO, que sur un terrain de beach ou sur un terrain de futsal. J'espère que nous aurons l'occasion de partager une bière et pas uniquement en regardant la Belgique se faire voler une demi-finale.

J'en profite également pour remercier toutes les personnes au sein du service de physio avec qui j'ai toujours eu un très bon contact et reçu un accueil chaleureux.

Au-delà d'un groupe, c'est également pour moi l'occasion de remercier les personnes de l'équipe 3 avec qui j'ai interagit au quotidien :

A Gilles, Merci d'avoir toujours eu de la bienveillance à mon égard. Ta voix reconnaissable entre 1000 raisons encore dans ma tête, et me fera encore sourire pendant longtemps ! Je suis déçu que la

tradition des pots n'ait pas perduré, car les « pots du Vendredi » ont grandement contribué à mon intégration dans le labo. J'espère revenir un vendredi et qu'il y aura du saucisson sur une table ! Merci

A Cécile, Merci pour ton aide à mainte et mainte reprise pour les analyses de qPCR. J'espère que les fiches techniques que j'aurais fait à ce sujet retranscrivons le plus fidèlement les connaissances que tu m'as transmises. Je te remercie également pour ta gentillesse au quotidien, j'ai eu grand plaisir à partager des repas du midi avec toi.

A Karen, Merci pour ta jovialité et ta gentillesse au quotidien. C'est grâce à toi que j'ai fait mes premiers pas au sein de l'unité il y a un peu plus de 3 ans. Tu as toujours été disponible pour me conseiller sur l'enseignement à la fois quand j'étais étudiant mais également dans ma fonction de moniteur.

A Gérard, Merci pour ton aide et ta bonne humeur contagieuse ! Toujours positif et souriant, c'était un plaisir de travailler à ton contact.

C'est également pour moi l'occasion de remercier les gens avec qui j'ai pu interagir au quotidien dans des situations aussi diverses que variées :

A Céline, alias Madame Placard merci d'avoir été le meilleur public que je puisse rêver d'avoir. Avec toi j'ai toujours eu l'impression que je pouvais faire Bercy alors que je sais pertinemment que j'ai l'humour d'un lion de mer. Merci pour ta gentillesse au quotidien et ton rire si communicatif. Profite bien de ta famille qui s'agrandie ! Par contre, arrête de pouponner JB ça m'agace !

A Patrick, merci d'avoir résolu avec rapidité mes problèmes (rares mais néanmoins limitant) de réseau. Merci également d'avoir toujours trouvé les mots pour me faire rire, et pas uniquement quand tu me parlais de Nîmes. Tu auras été la seule personne capable de me faire regarder un Saint-Etienne/Nîmes au foot.

A Annick, Merci pour ton aide tout au long de ces 3 années, en toute circonstance tu avais une réponse à mes interrogations. Je salue ta polyvalence et ton dévouement pour cette unité.

Un grand merci à Marie, Norbert et Jean-Yves pour votre aide et votre accompagnement depuis la fin de mon deuxième master. Vous avez contribué à ma bonne insertion dans le doctorat et le monitorat.

À Anne, Je ne te remercie bien sûr pas pour les frayeurs que tu as pu me faire dans les sous-sols de l'unité : grand moment de virilité de ma part ! En revanche, je te remercie d'avoir pris le temps de m'initier aux manipes de calcium et bien plus encore !

À Olivier, Merci pour tes conseils et tes questions qui tuent, qui m'ont régulièrement poussé à comprendre toujours un peu plus loin.

À Jérémy, Merci d'avoir été un bon encadrant pour Mathilde (même si tu l'as souvent fait pleurer...) et merci de m'avoir fait découvrir des saveurs de bières venues de l'Armorique lointaine !

À Albano, Merci pour tes analyses en géopolitique internationale et tes smatches de volley caractéristiques. Merci d'avoir essayé d'animer la vie du labo à chaque fois d'une manière différente.

À Sandrine Faure et Pascal DSB (oui pour vous je suis obligé de préciser le nom de famille tellement vous êtes nombreux avec ces prénoms) Merci pour votre passion de la Science et vos conseils avisés en toutes circonstances. J'aurais réellement aimé faire un semi-marathon avec vous, peut-être un jour, qui sait ?

À Stéphane, Merci pour les nombreux conseils et anecdotes généralement prodigués autour d'un verre du pot ou d'une table le midi. J'aurais également aimé courir avec toi, juste une fois, pour voir ma marge de progression.

À Lucile, Merci d'avoir repris le journal club avec des ambitions et le désir de faire évoluer cette institution. Bon courage pour la fin de ta thèse !

À Amandine, Amandine G/4 et Delphine, Merci pour votre gentillesse au quotidien.

À Fabienne, Daylet, Patrice, Azzouz et Bruno, Merci pour votre aide au quotidien et de faciliter notre travail.

A Alain Varray et Nelly Héraud, je tiens à vous remercier pour l'aide que vous m'avez apporté dans le cadre de mes travaux mais également à plus large titre, dans mon intégration au sein de l'école doctorale.

A Brice, Nicolas, Steven et Said d'ArtFX, Merci pour les bons moments passés à créer un jeu dont la portée va au-delà « d'un simple jeu créé en 48h. »

A Jana, J'ai été très heureux de partager avec toi plus qu'une paillasse. Je serai toujours ravi de t'accompagner pour voir un match de handball, boire des bières ou manger des planches de charcuteries ! Tu as été une de nos meilleures recrues pour le futsal. Merci pour ton aide et au plaisir de te revoir !

La rédaction de ce manuscrit c'est finalement pour moi l'occasion de remercier mes amis et ma famille, qui me soutiennent depuis tant d'année. Ce manuscrit est en quelques sorte une trace dans le temps de mon engagement envers eux.

A mes comparses de l'organisation de la JED, Elise, Antoine et Vincent, c'est à chaque fois un plaisir de vous retrouver, bien que se soit systématiquement pour picoler et faire des blagues salaces. J'espère que nous continuerons d'entretenir notre belle relation et pourquoi pas au sein des alumnis de l'ED.

A Yvonne « l'arnaqueuse Libanaise » et Mohamad « le Boucher de Beyrouth » (cf. Photo organigramme), vous avez constitué une très belle délégation Libanaise durant ces 3 années. Je vous remercie d'avoir apporté au labo un peu de votre pays et de votre culture que j'avais déjà eu plaisir à découvrir avec Sarah. J'espère qu'avec Mathilde nous aurons un jour la possibilité de visiter votre pays et que vous nous le fassiez visiter. Merci :

A Gaby, Il est loin le moment où tu jouais les entremetteuses avec Laeti. Après tout ce chemin parcouru je peux dire que vous avez fait du bon boulot ! Vous avez d'ailleurs été des acolytes de génie pour les 25 ans de Mathilde. Ton arrivée au labo a été à la fois une bonne et une mauvaise surprise car cela signifiait qu'une tête connue arrivait au labo, mais que mon départ approchant, je n'en profiterais pas longtemps. J'espère que nous aurons l'occasion de nous revoir.

Merci à mes partenaires de Kaamelott Albin et JB venus de contrées lointaines dont la beauté nous a été constamment rabâchée. A l'heure où j'écris ces quelques lignes nous n'avons toujours pas fait de soirée « spécial Kaamelott », ni regardé « les yeux dans les bleus », ni regardé les deux finales de coupe du monde gagnées par la France. Il va falloir absolument remédier à cela ! J'ai partagé avec vous de si bons moments, que j'emporte un peu de Poitiers avec moi à Lyon. Et surtout n'oubliez pas l'héritage que je vous ai laissé : le barbecue de l'unité. Faites-en bonne usage et que la tradition perdure !

A P-E alias Encarta2000, merci d'avoir chaque jour un peu plus développé ma connaissance du monde qui nous entoure. Je pense définitivement que tu es l'une des personnes les plus cultivées que je connaisse et que tu devrais tout lâcher pour aller à une émission de télé et gagner un max de pesos avec ton cerveau ! J'ai également découvert que sous la blouse de VRP (<3) il y a un grand footballeur et même si en futsal tu m'auras toujours fait peur, je regrette que nous n'ayons pas pu faire un dernier match en guise de jubilé. Après ces deux années, je peux affirmer que j'aurais toujours un grand plaisir à te solliciter car j'ai pu voir en toi un ami dévoué, fidèle et plein d'humour : la marque de fabrique des grands hommes.

A Monia et Karim, je vous remercie de m'avoir respectivement prodigué des conseils make-up/musicaux et des conseils en pose de grillage entre les jambes ! Vous avez toujours été prêts à me tendre la main en toute circonstance. Vous avez peut-être le teint sombre à l'extérieur mais vous êtes brillants à l'intérieur. Monia, je te remercie pour ta gentillesse au quotidien, pour ces rires que tu m'évoques par ta mauvaise foi italienne légendaire, mais également par ta faculté à clasher à tour de bras. Ta soutenance arrive également à grand pas et je ne doute absolument pas de ta capacité à finir en beauté, vu ton acharnement et ta rigueur. Ce sera peut-être une occasion pour goûter ces fameuses pâtes au pesto dont on entend régulièrement parler et ce sera encore une belle occasion de retrouver ta joie et ta bonne humeur. Merci !

A Joe et Dany, que dire de plus que merci pour ces supers moments passés durant ces 3 ans. Je suis fier de vous compter parmi mes amis, car outre la générosité dont vous avez toujours fait preuve à mon égard, vous rayonnez dans nos vies (à Mathilde et à moi). Il y a encore beaucoup de chose que nous n'avons pas encore vécus ensemble, et c'est tant mieux car ce sont autant d'occasions de se retrouver. Je ne peux que vous souhaiter le meilleur pour l'avenir. Je pense sans me tromper que nous serons présents aux grandes étapes de votre vie qui s'annonce bien belle. Merci.

Je souhaite remercier les membres de ma belle-famille Marie-Noëlle, Robert, HP, Léna et Maxime, qui m'ont intégré dans la grande tradition des tombolas, au cours desquelles j'ai grand plaisir à dicter les numéros.

A Géraldine et Hubert, je vous remercie pour toute l'aide et le soutien que vous m'avez apporté durant maintenant plus de 5 ans. Vous m'avez intégré au sein de votre famille avec la plus grande confiance, et je vous remercie pour toute la générosité que vous me témoignez au quotidien.

A Morgasme, Dawid et Gré pour m'avoir toujours soutenu comme si j'étais un prix Nobel. Je ne compte plus les moments de pur délire que vous m'avez offert (l'escapade à Lyon pour mon anniversaire restera un des plus beaux souvenirs). Je suis content de voir que notre famille, qui s'agrandit d'année en année, pourra compter sur des personnes telles que vous pour la mener vers la joie et le bonheur qui vous caractérisent.

A Tio Juan et Tatie Cath, je vous remercie pour tout ce que vous avez fait pour moi. Vous avez été comme des parents de substitutions durant cette 3^{ème} année de licence. Vous m'avez accueilli et enrichi de cette lumière qui caractérise le cœur des gens du Nord. Je vous remercie d'avoir contribué à faire de moi l'homme que je suis aujourd'hui. Merci.

A mon cousin Juju, Merci pour toute ton aide et ton soutien durant toutes ces années, depuis tout petit tu es comme un grand frère, toujours dans les bons coups. Du casting raté à Money Drop à notre rôle d'officiant du mariage de Mélita, tu t'es toujours montré protecteur et inspirant. Je pense que s'il y a un modèle que je suis depuis tant d'année, c'est toi. Merci.

Je suis fier de pouvoir dire à mes sœurs Mélita et Farilde, que leur petit frère a désormais bien grandi depuis l'époque où vous pouviez le « noyer » dans la piscine. Je vous remercie pour tout ce que vous avez fait durant toutes ces années. J'ai l'impression que si les moments difficiles nous ont soudé, les moments de joie nous ont littéralement fait fusionner. Grâce à votre bienveillance et votre esprit protecteur, j'ai chaque jour un peu plus l'impression que nous sommes une fratrie indestructible. Merci pour ce que vous êtes.

A ma maman Elisa, Tu as toujours fait en sorte que je puisse étudier et vivre dans les meilleures conditions. Malgré toutes les embûches et les péripéties que la vie a mis sur notre route, tu n'as jamais cessé de me soutenir et de croire en moi. Je pense donc qu'il serait vain de vouloir exprimer en quelques mots toute la gratitude et le respect que j'ai pour toi. Je pense que la meilleure des

manières que j'ai de te remercier, est « juste » de continuer de faire de mon mieux en toute circonstance comme tu me le rappelles chaque jour, pour que de cette manière tu continues d'être fière de ton petit poutch ! Merci maman.

Il est finalement temps pour moi de remercier la personne qui partage ma vie depuis plus de 5 ans. Celle qui aura vécu cette thèse un peu comme un « remake » de la sienne.

O Mathilde, je te remercie pour tout l'amour que tu me témoignes chaque jour au quotidien. J'imagine que je n'ai pas dû être le chéri idéal tous les jours cette année, mais sache que je te remercie pour le soutien que tu m'as apporté malgré la distance. Je te remercie également pour toute la patience dont tu fais preuve quotidiennement pour ne pas craquer face à : ma conduite sportive, ma manière de me cogner (partout et tout le temps), mes lubies rocambolesques (vouloir devenir jardinier, entrepreneur, web designer...) ou encore face à ma fâcheuse tendance de ne jamais vouloir faire comme les autres. Sache que je continuerais de te faire « honte » car je sais, qu'au fond, cela te donne le sourire. Une grande page se tourne pour nous deux aujourd'hui et un nouveau chapitre s'ouvre. Une nouvelle vie dans une nouvelle ville (pas si nouvelle pour toi), un nouveau chez nous, à découvrir de nouveaux restaurants, à voyager dans des villes où on ne parle pas français et bien d'autres choses encore nous attendent. Tu es la meilleure. Je t'aime.

Tables des matières

LISTES DES ABREVIATIONS	15
LISTES DES FIGURES	19
<u>PARTIE 1 : REVUE DE LITTERATURE</u>	
1. LA BRONCHOPNEUMOPATHIE CHRONIQUE OBSTRUCTIVE	22
1.1 DEFINITIONS :	22
1.2 DIAGNOSTIC	22
1.3 ETIOLOGIES :	26
1.3.1 Tabagisme et facteurs environnementaux :	26
1.3.2 Âge et Sexe :	26
1.3.3 Facteurs génétiques	27
1.3.4 Développement des poumons	28
1.3.5 Asthme, Bronchites chroniques, infections pulmonaires	29
1.3.6 Le statut socio-économique	29
1.4 LA BPCO, UN FARDEAU SOCIO-ECONOMIQUE - QUELQUES CHIFFRES EPIDEMIOLOGIQUES	30
1.4.1 Prévalence	30
1.4.2 Mortalité	31
1.4.3 Coûts socio-économiques	31
1.5 PHYSIOPATHOLOGIE DE LA BPCO	32
1.5.1 L'atteinte pulmonaire	32
1.5.1.1 <i>Inflammation</i>	32
1.5.1.2 <i>Modifications structurales</i>	32
1.6 ATTEINTE PERIPHERIQUE ET MORBIDITES	34
1.6.1 Comorbidités et pathologies multiples	34
1.6.2 Atteinte musculaire	36
RESUME	38

2	LA DYSFONCTION MUSCULAIRE DANS LA BPCO & ET LIMITES DES INTERVENTIONS THERAPEUTIQUES	39
2.1	MANIFESTATIONS CLINIQUES DE LA DYSFONCTION MUSCULAIRE CHEZ LE PATIENT BPCO	39
2.2	IMPLICATION DE LA PERTE DE MASSE DANS LA DYSFONCTION MUSCULAIRE	41
2.2.1	Rôle de la masse dans le déficit de force	41
2.2.2	Rôle de la masse dans le défaut d'endurance	41
2.3	REGULATION DE LA MASSE MUSCULAIRE	41
2.3.1	La synthèse protéique	41
2.3.2	La dégradation protéique	43
2.3.3	Autres mécanismes impliqués dans la régulation de la masse	45
2.4	REGULATION DE LA MASSE MUSCULAIRE DANS LA BPCO	47
2.4.1	Dégradation protéique dans la BPCO	47
2.4.2	Synthèse protéique dans la BPCO	48
2.4.3	Régénération, apoptose, sénescence dans la BPCO	48
2.5	ETIOLOGIES DE LA PERTE DE MASSE MUSCULAIRE	50
2.5.1	La réduction d'activité physique	50
2.5.2	Malnutrition / dénutrition	53
2.5.3	Glucocorticoïdes	54
2.5.4	Hypoxémie / Hypercapnie	54
2.5.5	Stress oxydant/nitrosatif	57
2.5.6	Inflammation	62
2.6	INTERVENTIONS THERAPEUTIQUES	65
2.6.1	Le REE	66
2.6.2	Optimiser le REE	67
2.6.2.1	<i>Supplémentation nutritionnelle</i>	67
2.6.2.2	<i>Pharmacothérapie / Oxygénothérapie</i>	67
2.6.2.3	<i>Electrostimulation neuromusculaire</i>	69
2.7	LIMITATIONS DES INTERVENTIONS	71
2.7.1	Limites de la supplémentation nutritionnelle	72
2.7.2	Limites de la supplémentation pharmacologiques et de l'oxygénothérapie	72

2.7.3	Limites de l'électrostimulation	74
2.8	LE "SPILL-OVER" : HYPOTHESE POUR EXPLIQUER LES LIMITES DES EFFETS BENEFIQUES DE REE	75
2.8.1	De l'inflammation pulmonaire à la dysfonction musculaire	75
2.8.2	Implication dans la dysfonction musculaire	77
2.8.3	Immunité et dysfonction musculaire	77
2.8.3.1	<i>IL-6</i>	77
2.8.3.2	<i>TNFα</i>	78
2.8.3.3	<i>TNF-like weak inducer of apoptosis (TWEAK)</i>	78
2.8.3.4	<i>IL-1β</i>	78
2.8.3.5	<i>IL-8</i>	79
2.8.3.6	<i>Protéine C Réactive (CRP)</i>	79
2.8.3.7	<i>Sérum Amyloïde A (SA-A)</i>	79
2.8.3.8	<i>Monocytes et Macrophages</i>	79
2.8.3.9	<i>Neutrophiles</i>	80
2.8.3.10	<i>Lymphocytes et Naturel Killer (NK)</i>	80
2.8.4	Limites et ajustements de la théorie	82
2.8.5	Autres molécules impliquées	85
RESUME		87
3	COMMENT ETUDIER LE ROLE DU SPILL-OVER DANS LA REGENERATION MUSCULAIRE	88
3.1	CULTURE PRIMAIRE DE MYOBLASTES HUMAINS : MODELE D'ETUDE DE LA REGENERATION MUSCULAIRE	88
3.1.1	Les étapes de la régénération musculaire	89
3.1.2	Modéliser les conditions physiopathologiques in vitro de la régénération musculaire	91
3.1.2.1	<i>Avantages</i>	91
3.1.2.2	<i>Conservation in vitro de phénotypes musculaires pathologiques acquis chez les malades chroniques</i>	93
3.1.2.3	<i>Modéliser l'hypoxie</i>	94
3.1.2.4	<i>Etudier le stress oxydant et le Spill-over</i>	95
3.1.2.5	<i>Modéliser l'activité physique par la stimulation électrique in vitro</i>	97
RESUME		100

PARTIE 2 : APPORT SCIENTIFIQUE

OBJECTIFS DE THESE ET AXES DE RECHERCHE	102
METHOLOGIES	110
Fiche technique 1 : Critères d'inclusion des sujets et constitution d'une banque d'échantillons sériques	111
Fiche technique 2 : Biopsie musculaire avec aiguille de Bergström modifiée	114
Fiche technique 3 : Mise en culture d'explants de biopsies musculaires humaines & obtention de cellules totales	117
Fiche technique 4 : Purification de myoblastes humains	120
Fiche technique 5 : Culture primaire de myoblastes humains	123
Fiche technique 6 : Electrostimulation <i>in vitro</i>	126
Fiche technique 7 : Immunofluorescence des myotubes et analyses de la morphologie cellulaire	128
Fiche technique 8 : Extraction et purification des protéines et ARN totaux	134
Fiche technique 9 : RT-qPCR	137
Fiche technique 10 : SDS-PAGE et <i>Western Blot</i>	141
RESULTATS DES ETUDES	145
ETUDE 1 Le stress oxydant régule l'autophagie dans les cultures primaires de cellules musculaires de patients atteints de BPCO	147
ETUDE 2 Effets d'un microenvironnement humain sur la différenciation de myoblastes humains	149
ETUDE 3 Rôle du microenvironnement BPCO en fonction de la sévérité de la maladie sur la différenciation de myoblastes humains sains	177
ETUDE 4 Le réentraînement à l'effort ne permet pas d'inverser les signaux atrophiques du sérum de patients BPCO sur les myotubes sains <i>in vitro</i>	195
ETUDE 5 L'électrostimulation <i>in vitro</i> révèle les défauts d'adaptation musculaire des myotubes de patients BPCO induits par l'exercice	213
SYNTHESE GENERALE ET PERSPECTIVE	233
LISTE DES COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES	247
APPORT NON-SCIENTIFIQUE	251
ANNEXES	257
Fiche technique complémentaire 1 : Evaluations cliniques : spirométrie, capacités fonctionnelles musculaires et tolérance à l'effort	258
Fiche technique complémentaire 2 : Réentraînement à l'effort	263
BIBLIOGRAPHIE	265

Listes des abréviations

4E-BP1	Eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1
4HNE	4-Hydroxy-2-nonenal
AChR	Acetylcholine Receptor
ActRI ou II	Activin type I (or II) Receptor
ADN	Acide Désoxyribo-Nucléique
AMP	Adénosine Mono-Phosphate
AMPK	AMP-activated Protein Kinase
AO	Aldehydes Oxidases
APS	Ammonium Persulfate
ARN_m	Acide Ribo-Nucléique messenger
AATD	Alpha-1 antitrypsin Deficiency
ATP	Adénosine Tri-Phosphate
ATS	American Thoracic Society
BH4	Tétrahydrobioptérine
BNIP3	(B-Cell lymphoma 2) Bcl2 interacting Protein 3
BODE	Body mass index, airflow Obstruction, Dyspnea, Exercice capacity index
BPCO	Bronchopneumopathie Chronique Obstructive
BSA	Bovine Serum Albumin
CAT	COPD Assessment Test
CCL2 / MCP1	Chemokine Ligand 2 / Monocyte Chemoattractant Protein 1
CDKN2a	Cyclin dependent kinase inhibitor 2A
CK	Creatine Kinase
CLER	Comité Local d’Ethique Recherche
CO₂	Dioxyde de carbone
CPP	Comité de Protection des Personnes
CRP	C Reactive Protein
CSA	Cross Sectional Area
Cu	Cuivre
CVF	Capacité Vitale Forcée
DALY	Disability Adjusted Life Year
DAMPs	Damage-Associated Molecular Patterns

DMEM	Dulbecco's Modified Eagles Medium
DMSO	Diméthylsulfoxyde
EDTA	Ethylènediaminetétraacétique
eNOS	Endothelial Nitric Oxide Synthase
EPS	Electrical Pulse Stimulation
ERS	European Respiratory Society
FMV	Force Maximale Volontaire
FoxO	Forkhead box de classe O
GC	Glucocorticoïdes
GH	Growth Hormone
GLUT4	Glucose Transporter type 4
GO	Glucose Oxidase
GOLD	Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease
GPx	Glutathione Peroxidase
GR	Glucocorticoid Receptor
GSK-3β	Glycogen Synthase Kinase 3 β
GST	Gluthathion-S-Transferase
H₂O₂	Péroxyde d'Hydrogène
HAS	Haute Autorité de Santé
HEPES	Acide 4-(2-Hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique
HHIP	Hedgehog Interacting Protein
HIF1α	Hypoxia-Inducible Factor 1 α
HTR4	5-HydroxyTryptamine Receptor 4
IdF	Index de Fusion
IFNγ	Interféron gamma
IGF-1	Insulin Growth Factor 1
IGF-1R	Insulin Growth Factor 1 Receptor
IL (ex : IL-6)	Interleukine
IMC	Indice de Masse Corporelle
IMM	Indice de Masse Maigre
IRS	Insulin Receptor Substrate
LPS	Lipopolysaccharides Bactériens
MAFbx	Muscle Atrophy F-Box Protein
MAP1LC3B	Microtubule-Associated Protein 1A/1B Light Chain 3B
MC	Milieu Conditionné

mi-R	Micro Acide Ribo-Nucléique
mMRC	Modified Medical Research Council
Mn	Magnésium
MRFs	Myogenic Regulatory Factors
MSTN	Myostatine
mTOR	Mechanistic Target Of Rapamycin
MuRF1	Muscle specific RING Finger Protein 1
Myf5	Myogenic Factor 5
MyHC ou MHC	Myosin Heavy Chain
MyoD	Myoblast Determination protein 1
MyoG	Myogénine
NAC	N-Acétylcystéine
NFAT	Nuclear Factor of Activated T-cells
NFκB	Nuclear Factor-kappa B
NK	Natural Killer
NMES	NeuroMuscular Electrical Stimulation
NO	Oxyde d'Azote
O₂	(di)Oxygène
OH	Radical Hydroxyle
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
p70S6K	(P70) Ribosomal protein S6 kinase beta-1
PaO₂	Pression partielle en oxygène
PBS	Phosphate Buffer Saline
PCr	Phospho-Créatine
PK1	Pyruvate Dehydrogenase Kinase 1
PGC1-α	(Peroxisome Proliferative Activated Receptor) PPAR gamma coactivator 1α
PI3K	Phosphoinositide 3-Kinase
PI3KCIII	PI3K class III complex
PPAR	Peroxisome Proliferative Activated Receptor
Prdxs	Peroxiredoxin
PSB-TCEP	Protein Solubilization Buffer Tris(2-carboxyéthyl) phosphine hydrochloride
PVDF	PolyVinylidene Fluoride
RAGE	Receptor for Advanced glycation End Products
REDD1	Regulated in Development and DNA damage response 1
REE	Réentraînement à l'effort

Rheb	Ras homolog enriched in brain
RNS	Reactive Nitrogen Species
ROS	Reactive Oxygen Species
RR	Réhabilitation Respiratoire
RT-qPCR	Reverse Transcriptase-quantitative PolyChainReaction
SA-A	Sérum Amyloïde A
SDI	Socio-Demographic Index
SDS-PAGE	Sodium DodecylSulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis
SL	Symptom Limited
SOD	Superoxyde Dismutase
SP-D	Surfactant Protein-D
SQSTM	Sequestosome
SVF	Sérum de Veau Foetal
TDM6	Test de Marche de 6 minutes
TEMED	Tétraméthylethylènediamine
TFAM	Transcription Factor A Mitochondrial
TGFβ	Transforming Growth Factor β
T_{lim}	Temps limite
TLR	Toll-Like Receptor
TNFα	Tumor Necrosis Factor α
Tris	Tris(hydroxyméthyl)aminométhane
TSC2	Tuberous Sclerosis Complex 2
TUNEL	Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP Nick End Labelling
TWEAK	Tumor Necrosis Factor-like weak inducer of apoptosis
ULK1	Unc-51 like autophagy activating Kinase 1
UPS	Ubiquitin-Proteasome System
UV	Ultra-Violet
V'O₂	Consommation d'oxygène maximale
VEMS	Volume Expiratoire Maximal par Seconde
WBS / SBS	Winter Bear Serum / Summer Bear Serum
XO	Xanthine Oxidase
Zn	Zinc
γH2AX	H2A Histone Family Member X gamma

Listes des figures

Figure 1 : Questionnaire d'évaluation des symptômes de dyspnée : questionnaires mMRC et CAT

Figure 2 : Outil de classification de sévérité « ABCD »

Figure 3 : Trajectoires potentiels de l'évolution de la fonction pulmonaire tout au long de la vie

Figure 4 : Trajectoires de la fonction pulmonaire au cours de la vie analysées conjointement dans la *Copenhagen City Heart Study* et la cohorte *Framingham Offspring*

Figure 5 : Illustration des modifications structurales pulmonaires dans la BPCO

Figure 6 : Graphiques illustrant la fréquence et la nature de comorbidités identifiées chez les patients BPCO et la fréquence de patients présentant des comorbidités multiples

Figure 7 : Graphiques du taux de survie en fonction (a) du déclin de la fonction pulmonaire et de l'atrophie musculaire et (b) de la force de contraction du quadriceps

Figure 8 : Schéma des manifestations cliniques et cellulaires de la dysfonction musculaire chez le patient BPCO

Figure 9 : Régulation de la masse musculaire par la voie de signalisation de la synthèse protéique IGF1/Akt

Figure 10 : Système ubiquitine protéasome : schéma d'action et principales voies de régulation de la masse par le système ubiquitine-protéasome

Figure 11 : Schéma global de la macroautophagie, la microautophagie et l'autophagie médiée par les protéines-chaperonnes et leur contribution dans la dégradation protéique et le recyclage des organites dans le muscle squelettique

Figure 12 : Spirale de l'exacerbation respiratoire et de la baisse du niveau d'activité menant à une réduction de la qualité et de l'espérance de vie chez le malade respiratoire chronique

Figure 13 : Schéma de l'inhibition par l'hypoxie de la synthèse protéique par la voie AMPK/TSC2/Rheb

Figure 14 : Schéma synthétique des voies de régulation du stress oxydant musculaire et des sites potentiels de production d'anion superoxyde et oxyde nitrique dans le muscle squelettique

Figure 15 : Représentation du lien temporel entre régénération musculaire et inflammation

Figure 16 : Représentation de la théorie du « Spill-over » dans les effets systémiques et comorbidités dans la BPCO

Figure 17 : Représentation de la complexité des interactions entre cellules de l'immunité et précurseurs myogéniques dans la régénération musculaire

Figure 18 : : Représentation des mécanismes influençant le mécanisme de « Spill-over » et sa détection.

Figure 19 : Représentation des mécanismes de régulation extrinsèque et intrinsèque de la cellule satellite par la niche cellulaire

Figure 20 : Chronologie du programme génique au cours des étapes de la différenciation et de la régénération musculaire après une lésion

Figure 21 : Représentation du cadre scientifique des études du manuscrit de thèse

Partie 1 : Revue de littérature

1. La Bronchopneumopathie Chronique Obstructive

1.1. Définitions :

Alors que les prédictions de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) ne l'envisageaient pas avant 2030, la bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO) a d'ores-et-déjà été classée 3^{ème} au rang des maladies causant le plus de décès dans le monde par *The Institute for Health Metrics and Evaluation*¹.

Réel fléau du XXI^e siècle, au même titre que le diabète, cette maladie respiratoire représente un intérêt majeur de santé publique, nécessitant la coopération de nombreux experts internationaux afin de ralentir sa progression. C'est dans cette optique que, depuis 1998, la « *Global Initiative for Chronic Lung Disease* » (GOLD) propose un rapport destiné aux cliniciens, permettant de rassembler les dernières données scientifiques concernant l'évaluation, le diagnostic et la prise en charge des patients².

En 2019, ce rapport a une nouvelle fois tenté de proposer une définition de cette maladie complexe et hétérogène. Celle-ci est définie comme : « une maladie fréquente, évitable et traitable caractérisée par des symptômes respiratoires et une limitation des flux d'air dus à des anomalies des voies respiratoires et/ou des alvéoles, majoritairement causées par une exposition significative à des particules ou gaz toxiques »².

1.2. Diagnostic :

Bien que très répandue, la BPCO reste cependant sous-diagnostiquée. On estime, en France qu'environ 7,5% de la population serait touché par la maladie, mais il est probable que cette estimation soit sous-évaluée, puisque La Haute Autorité de Santé (HAS) estime que 66 à 90% des malades ne sont pas diagnostiqués³.

Une BPCO peut être suspectée dès lors qu'un patient présente une dyspnée (difficulté à la respiration), une toux ou des expectorations chroniques avec des antécédents d'infections bronchiques récurrentes et/ou une exposition à des facteurs de risque. Le diagnostic est confirmé par la spirométrie permettant de mesurer, entre autres, un paramètre d'obstruction des voies aériennes : le rapport de Tiffeneau qui correspond au Volume Expiré Maximal-Seconde sur Capacité Vitale Forcée (VEMS/CVF). Un patient est atteint d'une BPCO lorsque celui-ci présente un rapport VEMS/CVF < 0,7, et ce même après l'utilisation d'un bronchodilatateur à courte durée d'action.

Questionnaire de dyspnée mMRC

Veillez cocher la case qui correspond à ce que vous ressentez (1 seule case)

Grade 0	Je suis essoufflé uniquement durant les exercices intenses	<input type="checkbox"/>
Grade 1	Je suis essoufflé lorsque je me dépêche sur le plat ou quand je monte une pente légère	<input type="checkbox"/>
Grade 2	Je marche moins vite que les gens de mon âge sur le plat ou je dois m'arrêter quand je marche à mon pas sur le plat	<input type="checkbox"/>
Grade 3	Je m'arrête pour reprendre mon souffle après 100 mètres ou après quelques minutes sur le plat	<input type="checkbox"/>
Grade 4	Je suis trop essoufflé pour quitter ma maison ou je suis essoufflé juste en m'habillant/me déshabillant	<input type="checkbox"/>

COPD Assessment Test (CAT)

Ce questionnaire mesure l'impact de la BPCO sur votre vie au quotidien. Pour chaque item indiquez d'une croix (X) la case qui correspond à votre état actuel. Vous ne pouvez sélectionner qu'une réponse par question

Exemple: Je suis heureux	①	②	③	④	⑤	Je suis triste	Points
Je ne tousse jamais	①	②	③	④	⑤	Je tousse tout le temps	
Je n'ai pas du tout de glaires (mucus) dans les poumons	①	②	③	④	⑤	J'ai les poumons entièrement encombrés de glaires (mucus)	
Je n'ai pas du tout la poitrine oppressée	①	②	③	④	⑤	J'ai la poitrine oppressée	
Quand je monte une côte ou une série de marches, je ne suis pas essoufflé(e)	①	②	③	④	⑤	Quand je monte une côte ou une série de marches, je suis très essoufflé(e)	
Je ne suis pas limité(e) dans mes activités chez moi	①	②	③	④	⑤	Je suis très limité(e) dans mes activités chez moi	
Je ne suis pas inquiet(e) quand je quitte la maison, en dépit de mes problèmes pulmonaires	①	②	③	④	⑤	Je suis très inquiet(e) quand je quitte la maison, en raison de mes problèmes pulmonaires	
Je dors bien	①	②	③	④	⑤	Je dors mal à cause de mes problèmes pulmonaires	
Je suis plein(e) d'énergie	①	②	③	④	⑤	Je n'ai pas d'énergie du tout	

Figure 1 : Questionnaires d'évaluation de la dyspnée et des symptômes : questionnaire mMRC (haut), questionnaire CAT (bas)

On classera alors la sévérité de la limitation des débits bronchiques selon 4 niveaux :

Classification	Sévérité	Valeur du VEMS
GOLD 1	Légère	VEMS \geq 80% de la valeur prédite
GOLD 2	Modérée	$50\% \leq$ VEMS $<$ 80% de la valeur prédite
GOLD 3	Sévère	$30\% \leq$ VEMS $<$ 50% de la valeur prédite
GOLD 4	Très Sévère	VEMS $<$ 30% de la valeur prédite

Cependant, outre la sévérité de la limitation des débits bronchiques, la nature et l'intensité des symptômes sont des paramètres importants dans l'évaluation générale de sévérité de la maladie. Cette évaluation des symptômes est généralement effectuée à l'aide de deux questionnaires (Figure 1) :

- Le questionnaire modifié du *British Medical Research Council* (mMRC)⁴
- Le *COPD Assessment Test* (CAT)⁵

De même, la connaissance de l'historique des exacerbations (définie comme une aggravation ponctuelle des symptômes entraînant une modification des traitements) est également un élément important de la sévérité de la maladie du patient. La fréquence des exacerbations est un facteur péjoratif du pronostic vital du patient et évaluer le nombre d'exacerbation, notamment celles ayant nécessité une hospitalisation, permet de mieux prévenir la survenue de nouveaux épisodes d'exacerbations⁶. Enfin, associé à la présence de comorbidités, l'ensemble de ces éléments constitue une évaluation combinée de la sévérité de la maladie classée en 4 niveaux (GOLD A, B, C et D – Figure 2) permettant ainsi de prédire les risques d'aggravation de l'état de santé des patients et d'orienter au mieux les stratégies thérapeutiques². (Figure 2)

L'établissement d'un score composite BODE (*Body mass index, airflow Obstruction, Dyspnea, Exercice capacity*) est également une alternative simple permettant d'évaluer le niveau de sévérité⁷. Il prend en compte la majorité des éléments de la classification « ABCD », notamment le VEMS, la distance parcourue au test de marche de 6 minutes (TDM6), la dyspnée et l'indice de masse corporelle (IMC) :

Score BODE	0	1	2	3
VEMS (% _{préd})	≥ 65	50 – 64	36 – 49	35 \geq
Distance au TDM6 (m)	≥ 350	250 – 349	150 – 249	149 \geq
Dyspnée (mMRC)	0 – 1	2	3	4
IMC	≥ 21	21 $>$		

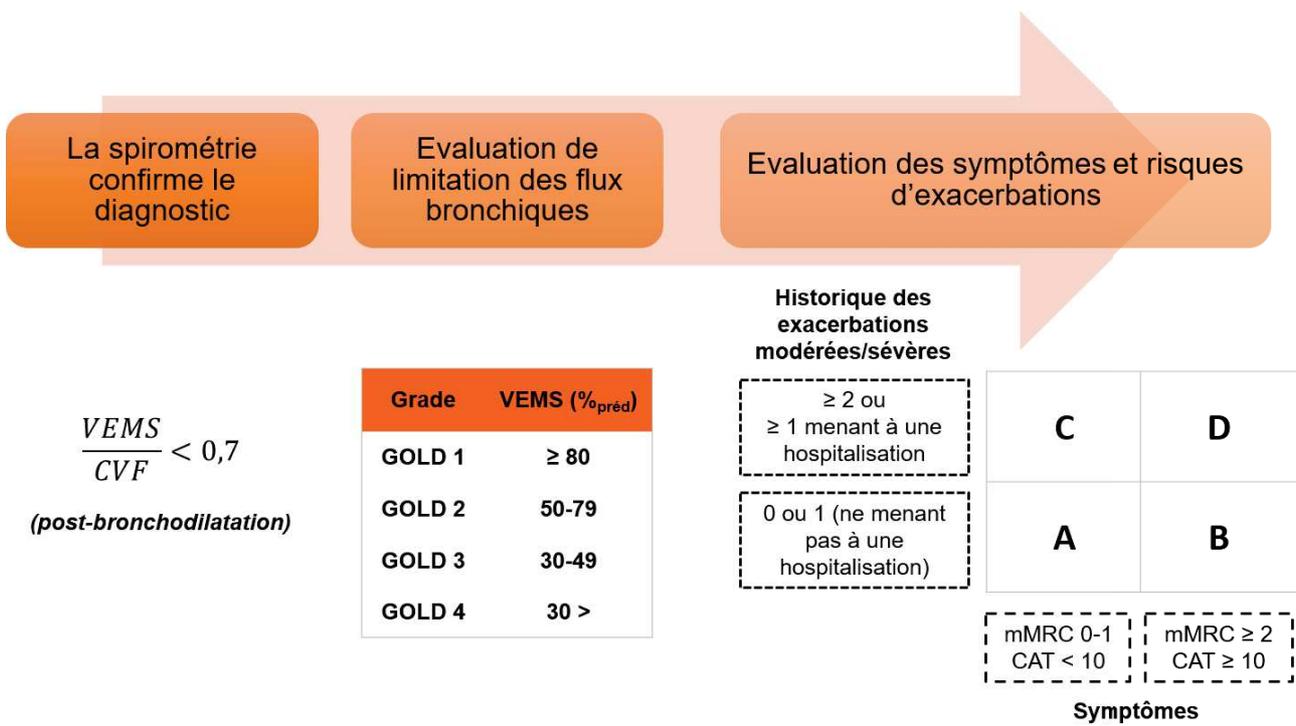


Figure 2 : Outil de classification de sévérité « ABCD » (adapté du rapport GOLD 2019²)

1.3. Etiologies :

1.3.1. Tabagisme et facteurs environnementaux :

Outre l'obstruction, la définition proposée par le rapport GOLD fait également mention des caractères « fréquente et évitable » de la maladie. Historiquement, Il était communément admis que la BPCO était une maladie principalement causée par l'inhalation de particules/gaz nocifs associés au tabac, provoquant ainsi un déclin précoce du VEMS⁸⁻¹⁰. Ceci ne concernant pas uniquement la cigarette de tabac ou de cannabis, mais également la pipe, les cigares et de manière plus inquiétantes l'e-cigarette, dont l'utilisation par les étudiants américains a triplé entre 2013 et 2014 ce qui pourrait annihiler les progrès obtenus ces dernières années¹¹.

Cependant, l'hypothèse d'une cause « unique » de la BPCO centrée autour du tabagisme semble clairement incomplète au regard de la part non-négligeable des patients (environ 30%) n'ayant jamais fumé. L'exposition dans le cadre professionnel à des poussières, aussi bien organiques que non-organiques, est également un facteur de risque important de la maladie¹². Cependant, l'exposition à des particules issues de pollutions environnementales ne s'arrête pas là. En effet, la combustion de biomasses (ex : fuel, bois, déchets agricoles...) pour la cuisine ou encore se chauffer représente également une part importante de la pollution intérieure impliquée dans les facteurs de risque de la maladie¹³. De plus, l'exposition à des produits chimiques notamment ceux employés dans les produits ménagers a récemment été décrit comme également en cause dans le déclin de la fonction pulmonaire et de l'obstruction bronchique, dans une mesure équivalente à un tabagisme à hauteur de 10 à 20 paquets-année¹⁴. L'ensemble de ces résultats conforte l'hypothèse d'un panel élargi des facteurs environnementaux dans l'étiologie de la BPCO, bien que le tabagisme reste l'un des facteurs majeurs¹⁵⁻¹⁷.

L'ensemble de ces facteurs environnementaux est à l'origine d'une réponse inflammatoire anormale des voies respiratoires, mais plusieurs autres facteurs de risque ont été identifiés dans le développement et l'évolution de la maladie. Parmi ces facteurs l'âge, le sexe, la présence de susceptibilité génétique, le développement des poumons, les antécédents médicaux liés à d'autres affections respiratoires, ainsi que le statut socio-économique sont les plus répandus.

1.3.2. Âge et Sexe :

Bien que l'âge se révèle être un facteur de risque important, il est difficile de distinguer s'il est simplement un indicateur du vieillissement de l'organisme, impliquant ainsi un déclin des fonctions pulmonaires ou s'il est également le reflet d'une exposition plus longue à des

substances toxiques¹⁸. De même, le sexe semble être un paramètre important dans la prévalence et le taux de mortalité, puisque les hommes seraient préférentiellement touchés par la BPCO, notamment en lien avec les habitudes de consommation¹⁹. Cependant, ces dernières années, il semblerait que non seulement les chiffres de prévalence se soient rééquilibrés, mais des études semblent indiquer que les femmes sont plus susceptibles de développer des formes sévères de la maladie^{20,21}.

1.3.3. Facteurs génétiques :

L'expression de certains gènes peut prédisposer au développement de la maladie. Bien qu'elle ne concerne qu'un nombre restreint de malades, la déficience en α 1-antitrypsine (AATD) est la mutation génétique la plus documentée. Outre les problèmes hépatiques, l'AATD provoque au niveau pulmonaire un défaut de protection contre l'activité protéasique de l'élastase neutrophilique, menant ainsi à la formation d'un emphysème²².

L'apparition d'emphysèmes peut également être modulée par un polymorphisme du gène codant pour la Métalloprotéinase 12. En effet, la mutation (-80A→G) dans cette protéine, impliquée dans la réponse inflammatoire induite par le tabac, semble augmenter la susceptibilité à développer une BPCO tant chez les fumeurs que chez les personnes n'ayant jamais fumé²³.

Ces dernières années, plusieurs études ont tenté d'identifier ces « gènes de susceptibilité » par des approches d'association génome-environnement. Elles ont notamment permis de montrer l'existence de gènes présentant des polymorphismes associés à des altérations de la fonction pulmonaire et/ou à la BPCO. Entre autre, ces mutations ont été retrouvées dans les gènes codant pour l'enzyme GST (défenses anti-oxydantes, synthèse de prostaglandines), la protéine HHIP (morphogénèse pulmonaire), le récepteur HTR4 (récepteur aux protéines G impliqué dans la réponse aux cytokines), la Tensine-1 (transduction de signaux via le cytosquelette) et également le récepteur RAGE (apoptose, stress oxydant et inflammation)^{24,25}. Une récente étude a comparé les séquences génétiques issues de 35 000 patients à celles de 220 000 sujets sains et a permis d'identifier 82 loci associés à la BPCO. Plus de la moitié (47) avait déjà été décrit dans des études relatives à la maladie ainsi qu'à la mesure de la fonction pulmonaire. Parmi les 35 nouveaux loci, 14 semblent également associés à l'asthme et la fibrose pulmonaire²⁶. Bien que ces études ne montrent pas de réel lien de causalité, elles permettent néanmoins d'ouvrir des pistes de recherches de nouvelles voies thérapeutiques.

1.3.4. Développement des poumons :

On distingue 3 phases dans le développement des poumons. Une phase de progression, relative à la croissance durant l'enfance débutant dès la naissance et pouvant durer jusqu'à 20 ou 25 ans. Une phase de plateau est ensuite observée. Elle dure quelques années durant laquelle la fonction pulmonaire est maximale. Puis, une phase de déclin progressif est observée, durant laquelle la fonction pulmonaire va naturellement diminuer avec le vieillissement²⁷. Ainsi, des événements pouvant altérer le bon développement des poumons, depuis la vie fœtale jusqu'à la vie adulte, représentent un risque dans le développement de la BPCO. En effet, chacune de ces 3 phases pourra alors être marquée par des événements pouvant moduler le développement de la fonction pulmonaire, qu'il s'agisse d'avant la naissance (facteurs héréditaires, tabagisme durant la gestation, restriction de croissance intra-utérine, naissance pré-terme < 37 mois...) ou après la naissance (dysplasie broncho-pulmonaire, exposition à des particules nocives, pollution, infections pulmonaires, asthme, tabagisme dans l'adolescence)^{28,29}. (Figure 3)

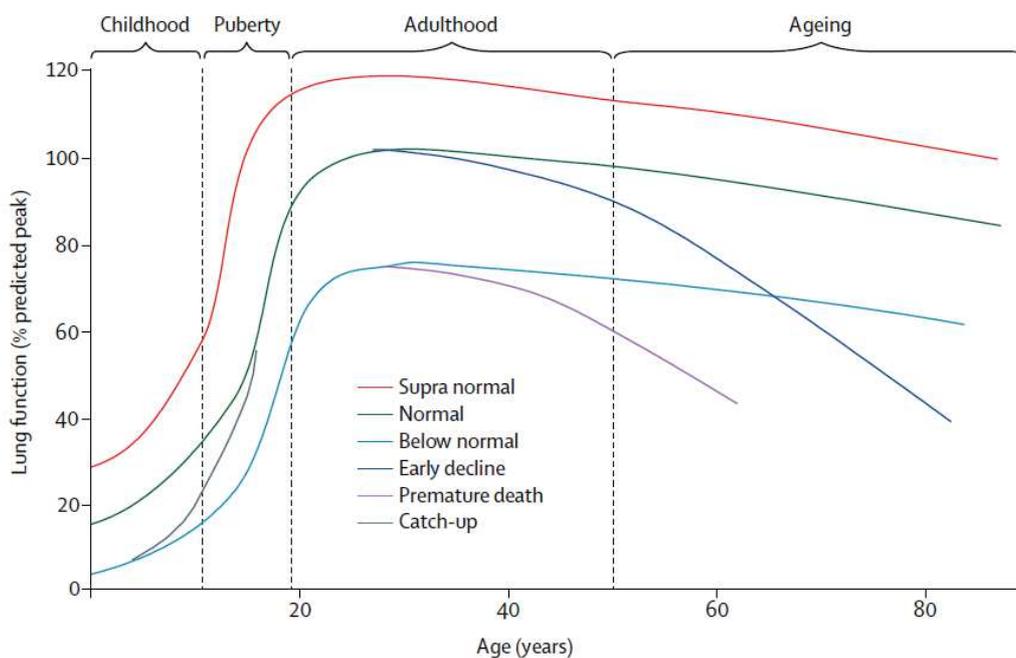


Figure 3 : Trajectoires potentielles de l'évolution de la fonction pulmonaire tout au long de la vie²⁷.

Cependant, le déclin précoce des fonctions pulmonaires n'est pas nécessairement associé au développement d'une BPCO. En effet, *Lange et coll*³⁰ rapportaient notamment que près de 17% des personnes présentant une chute du VEMS de manière précoce, ne développaient pas de BPCO ultérieurement. A l'inverse, environ 5,5% des personnes

souffrant de la maladie ne présentaient pas d'anomalie pulmonaire durant leur jeunesse. (Figure 4)

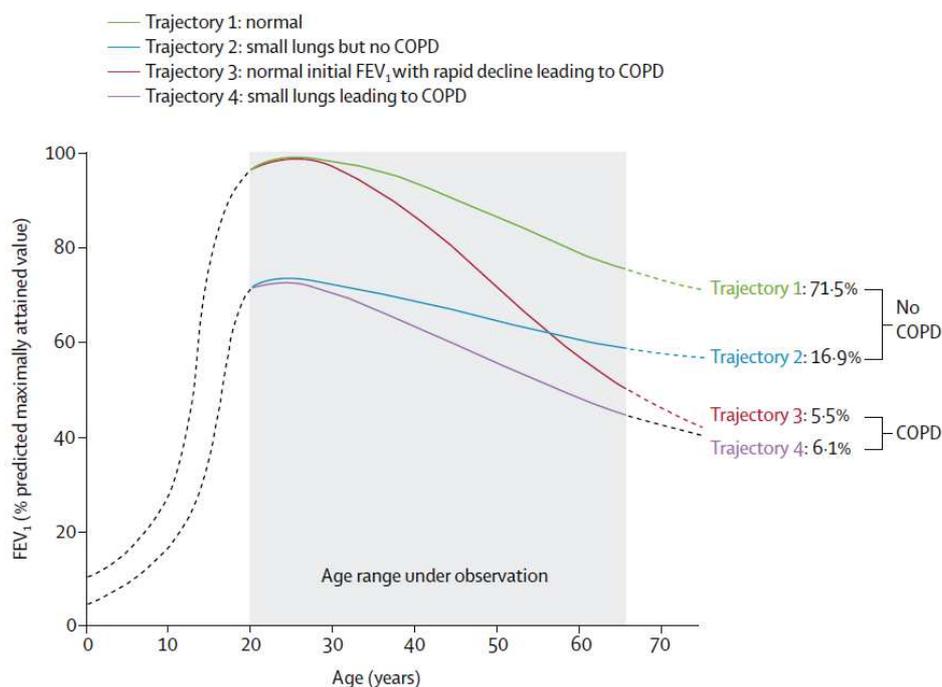


Figure 4 : Trajectoires de la fonction pulmonaire au cours de la vie analysées conjointement dans la Copenhagen City Heart Study et la cohorte Framingham Offspring (Figure de Agustí et Faner²⁷ adaptée de Lange et al³⁰)

1.3.5. Asthme, bronchite chronique, infections pulmonaires :

Comme évoqué précédemment, les maladies respiratoires survenant dans l'enfance et l'adolescence sont un facteur de risque important de développement d'une obstruction chronique. Diagnostiquées dans l'enfance, les personnes atteintes d'asthme ont 12,5 fois plus de risque de développer une BPCO, et 10 fois plus de risque de développer les symptômes d'une bronchite chronique³¹. La bronchite chronique étant également un marqueur précoce du développement d'une BPCO³². En 2011, l'étude de *de Marco* et coll soulignait le caractère déterminant du phénomène d'hyperréactivité bronchique, de l'asthme et des infections pulmonaires dans le développement d'une BPCO³³.

1.3.6. Le statut socio-économique :

Le niveau socio-économique et la pauvreté représentent également une part non-négligeable dans le développement d'une obstruction bronchique^{34,35}. En effet, il a été montré l'existence d'une relation inverse entre le ratio VEMS/CVF et la richesse des foyers,

qui expliquerait à elle seule au moins 35% de la variation dans la prévalence de développer une obstruction chronique³⁶.

Cependant, il reste encore difficile de définir la relation qu'il peut exister entre l'exposition à la pollution, une alimentation déséquilibrée et le faible niveau économique. Notamment par le fait que le niveau socio-économique individuel reste une notion fluctuante à mesurer. En général évalué *via* 3 items – le niveau d'éducation, la profession et le revenu – le niveau socio-économique dépend également de nombreuses variables non-mesurables inhérentes à un pays (ex : facilité d'accès au soin, chômage...). De plus, certains modes de consommation peuvent également dépendre du pays dans lequel on se situe : dans un pays pauvre, le tabagisme est une pratique associée aux classes sociales les plus aisées, alors que le tabagisme dans les pays développés est généralement plus important dans les catégories sociales modestes. A noter qu'il est possible que l'économie des ménages joue également un rôle prépondérant dans les modes de consommation et les mécanismes de prise de décisions³⁷.

1.4. La BPCO, un fardeau socio-économique – quelques chiffres épidémiologiques

1.4.1. Prévalence :

Il est compliqué d'estimer avec précision la prévalence de la BPCO à travers le monde pour deux raisons : la première vient du fait que la majorité des publications ne prend en compte que la spirométrie et non l'association avec des symptômes cliniques, pour le diagnostic de la BPCO. La seconde vient d'une méconnaissance ou d'un sous-diagnostic de la maladie. En effet, *Quach et coll* ont pu estimer en 2015, qu'au sein d'une même région d'un pays développé tel que la France, la prévalence de la BPCO pouvait s'étaler de 9,5 à 16% chez les personnes à risque, avec près de 75% des sujets qui n'avaient jamais été diagnostiqués³⁸. Cette statistique alarmante fait d'ailleurs écho à l'étude de *Lamprecht et coll* en 2011, qui avaient déjà évalué à 81.2% les sujets non-diagnostiqués³⁹. Ceci rappelle l'importance d'avoir des critères d'évaluations homogènes afin d'obtenir des chiffres plus précis concernant la prévalence, tant de manière locale qu'internationale.

Effectivement, des variations sont également observables d'un pays à un autre. En Europe, une étude Autrichienne avait estimé qu'au moins un quart de la population de plus de 40 ans de Salzburg présentait une obstruction, alors qu'outre Atlantique l'étude PLATINO publiait des écarts de prévalence au sein de 5 villes d'Amérique Latine allant de 7,8% (Mexico City – Mexique) à 19,7% (Montevideo – Uruguay)^{40,41}. La prévalence dépendant ici de facteurs inhérents à chaque région, tels que l'altitude mais également l'exposition aux

facteurs de risque évoqués précédemment. Malgré ces différences, on estime que la prévalence de la BPCO chez les non-fumeurs est d'environ 9 à 12%, ce qui représentait en 2010 environ 384 millions de personnes touchées^{3,41-44}. Malheureusement, les récentes prévisions de l'OMS (octobre 2018) ont une nouvelle fois revu à la hausse les chiffres de prévalence pour 2030.

1.4.2. Mortalité

Ces 20 dernières années ont été marquées par des prédictions de plus en plus alarmantes concernant le fardeau que représente la BPCO. Ces nouvelles prédictions de l'OMS placent ainsi la BPCO au 3^{ème} rang des maladies les plus meurtrières en 2016 avec 5,3% de la mortalité globale (avec 14 ans d'avance sur les précédentes estimations). Malheureusement, ce nouveau rapport n'est pas plus optimiste pour les années à venir, puisqu'il semble indiquer une augmentation du nombre de décès attribuables à la BPCO à 5,7% pour 2030 et 6,9% pour 2060^{45,46}.

1.4.3. Impacts socio-économiques

Outre le problème de santé publique que représente la BPCO, elle est également un lourd fardeau socio-économique. En Europe, on estime que les dépenses liées à la BPCO représentent 6% du budget des soins de santé et plus de la moitié des coûts liés à la prise en charge des maladies respiratoires, soit un peu plus de 140 milliards d'euros avec 48,4 milliards d'euros de coûts directs et indirects, le reste étant des coûts relatifs aux préjudices liés à l'espérance de vie en mauvaise santé (*Disability-Adjusted Life-Years – DALYs*)⁴⁷. Aux Etats-Unis, on évalue l'ensemble de ces coûts directs et indirects à plus de 50 milliards de dollars⁴⁸. Il est cependant admis que ces chiffres sont sous-évalués. A titre d'exemple, l'aide au soin apportée par un membre de la famille au domicile du patient est difficilement quantifiable, d'autant plus s'il a dû quitter son travail⁴⁹. Ceci est encore plus vrai dans les pays ayant un faible niveau socio-économique car le système de santé est moins à même de pouvoir soutenir les malades les plus amoindris sur le long terme.

Ces chiffres ne sont malheureusement pas prêts de diminuer au regard du vieillissement de la population et de l'espérance de vie grandissante. En 2018, l'étude *Global Burden Disease* a mis à jour les chiffres concernant l'espérance de vie et a relevé qu'en moyenne celle-ci avait progressé de 7,4 ans entre 1990 et 2017. Bien que cette hausse traduise une meilleure hygiène de vie globale, avec un accès aux soins de meilleure qualité, elle s'accompagne irrémédiablement d'un allongement de l'espérance de vie en mauvaise santé. L'augmentation de la période de DALY dans les pays développés est d'autant plus importante que l'espérance de vie est haute. En effet, alors que l'on observe

un gain de 10,5 ans d'espérance de vie dont 1,5 ans de DALY (14%) dans les pays à faible indice socio-économique (SDI), l'espérance de vie a « seulement » progressé de +3,8 ans dans les pays à haut SDI, dont 1,3 ans de DALY (34%)⁵⁰. Il semble donc évident que les coûts en matière de prise en charge des malades continueront d'augmenter tant qu'aucun changement de comportement vis-à-vis de l'exposition aux différents facteurs de risque n'est adopté.

1.5. Physiopathologie de la BPCO :

1.5.1. L'atteinte pulmonaire

1.5.1.1. *Inflammation*

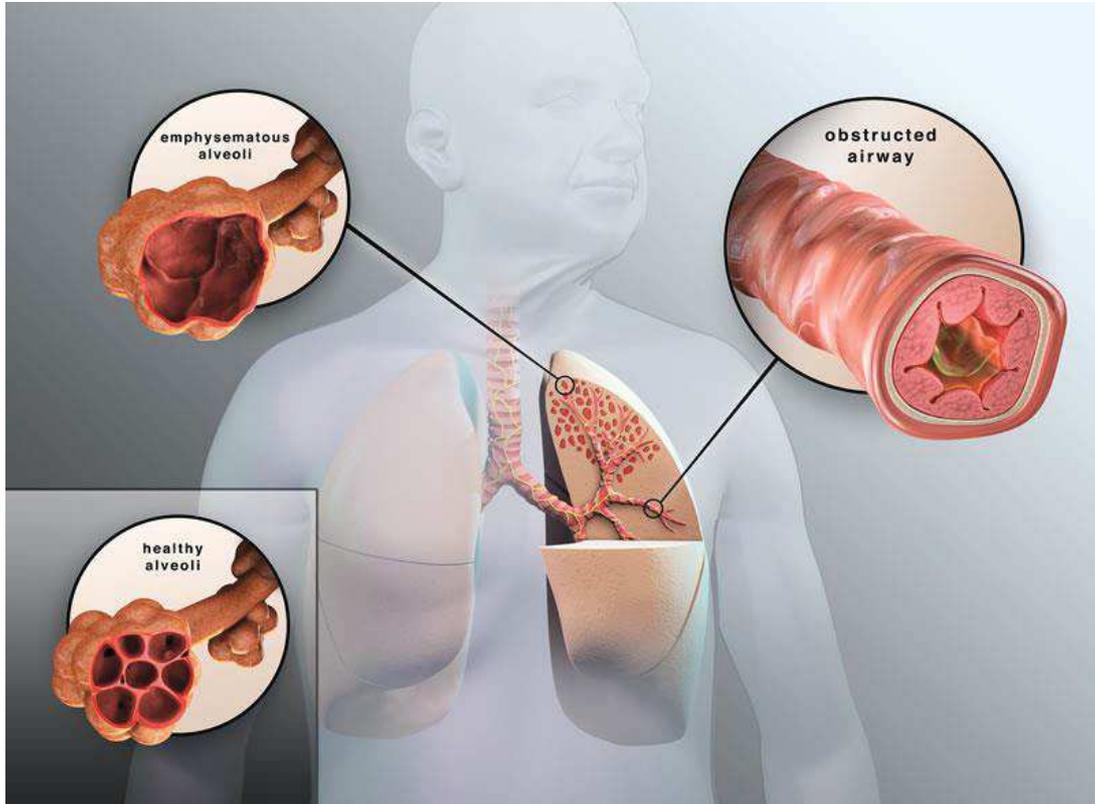
Bien que majoritairement étudiée dans le cadre du tabac, l'inhalation de particules/gaz nocifs induit une réponse inflammatoire pulmonaire qui met en jeu à la fois les systèmes immunitaires inné et adaptatif, avec une augmentation du nombre de neutrophiles, de macrophages, de cellules dendritiques et de lymphocytes T et B. Cependant, chez le patient BPCO, cette réponse semble persistante, même après 1 an de sevrage tabagique^{9,51,52}. Cette persistance est le reflet de défauts dans les mécanismes de défense et de régénération suite à l'exposition à un agent toxique, qui entraînent des modifications structurales à l'origine des limitations pulmonaires.

1.5.1.2. *Modifications structurales :*

Les deux grandes modifications structurales que l'on observe dans la BPCO sont : le remodelage et l'obstruction des petites voies aériennes (obstruction), et la destruction du parenchyme pulmonaire (emphysème)⁵³.

Le remodelage des petites voies aériennes se caractérise par un épaississement du tissu musculaire lisse et la mise en place d'une fibrose par une accumulation de tissu conjonctif^{54,55}. Ce remaniement a pour effet d'augmenter la résistance des parois des voies aériennes au passage de l'air et de provoquer leur occlusion.

L'emphysème pulmonaire correspond quant à lui à la destruction du parenchyme pulmonaire. Cette dégradation est le résultat de l'activité protéasique, oxydante et apoptotique mis en place par les cellules du système immunitaire afin de nettoyer et réparer les tissus endommagés par l'inhalation de gaz toxique. Cependant, à l'inverse de certaines maladies où la réponse inflammatoire s'estompe et les mécanismes de régénération se mettent en place, dans la BPCO ces processus immunitaires mènent à la destruction du tissu pulmonaire^{56,57}.



*Figure 5 : Illustration des modifications structurales pulmonaires dans la BPCO :
L'emphysème alvéolaire (haut à gauche) comparé à une alvéole saine (bas gauche)
et obstruction des petites voies aériennes liée au remodelage (haut à droite)*

L'ensemble de ces modifications menant à une altération des dynamiques d'échanges gazeux par rétention d'air et à un phénomène d'hyperinflation, participent à la réduction des flux d'air inspiré/expiré observés chez le patient BPCO. (Figure 5)

1.6. Atteinte périphérique et morbidités :

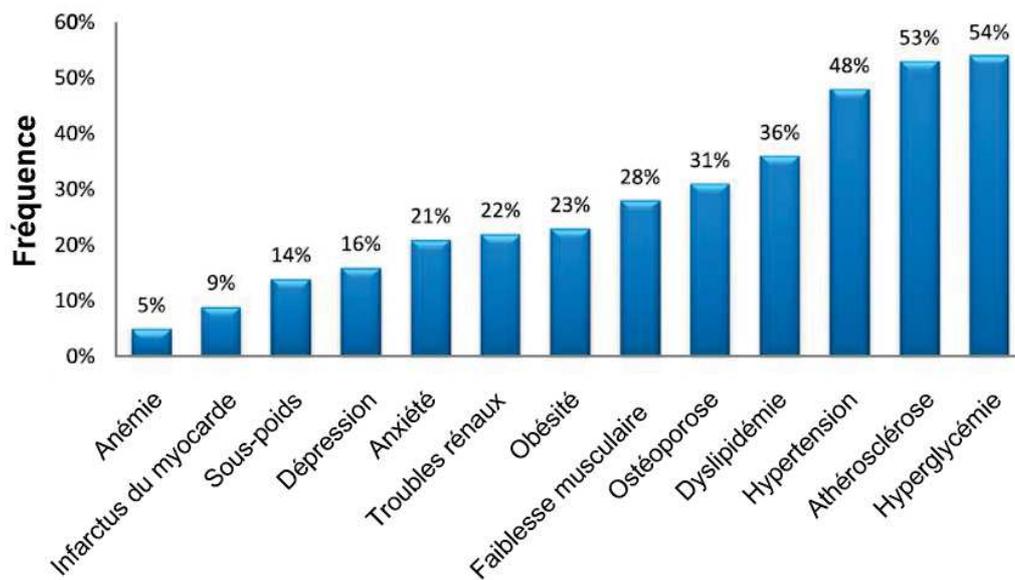
1.6.1. Comorbidités et pathologies multiples :

Comme évoqué plus haut, la BPCO n'est pas seulement inquiétante du point de vue de la mortalité, elle l'est également du point de vue de la morbidité. En effet, la majorité des patients sont atteints par une ou plusieurs maladies chroniques associées à la BPCO que l'on qualifie de comorbidités. Celles-ci ont des facteurs de risques similaires à la BPCO (âge, tabagisme, sédentarité...) et représentent un enjeu majeur dans la prise en charge des patients, car elles participent également à la détérioration de leur qualité de vie, ainsi qu'à leur moins bonne espérance de vie⁵⁸⁻⁶². De plus, elles représentent une difficulté supplémentaire dans la prise en charge des patients car il est nécessaire de traiter chaque comorbidité avec le traitement approprié. Bien que rien n'indique qu'il faille traiter la BPCO et chacune des comorbidités associées différemment, lorsqu'elles sont en association, il est généralement préférable de préserver la qualité de vie des patients en évitant la sur-médication².

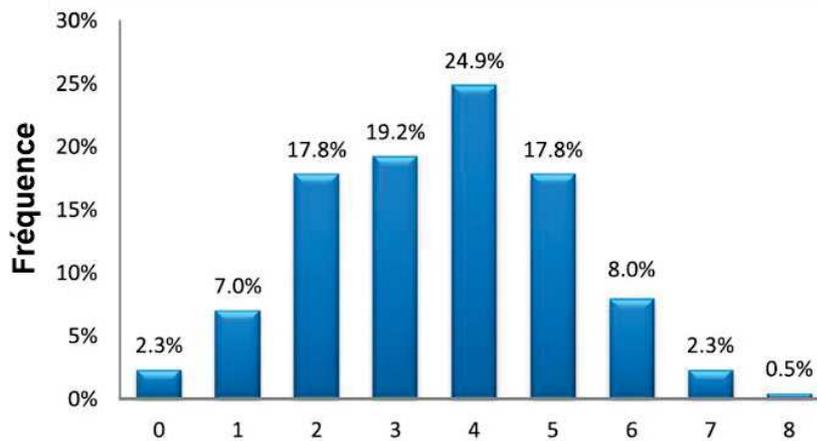
En 2013, *Vanfleteren et coll* avaient identifié que sur 213 patients BPCO, 97,7% étaient atteints d'au moins une comorbidité, et plus de la moitié (53,5%) en cumulait au moins 4⁶³. Parmi les comorbidités les plus fréquentes on retrouve (Figure 6) :

- Les atteintes cardio-vasculaires : cardiopathies ischémiques, infarctus, arythmies, atteintes vasculaires périphériques et hypertension
- Les pathologies respiratoires : cancer, bronchiectasies, apnée du sommeil
- Les maladies métaboliques : syndrome métabolique, diabète, troubles digestifs
- Les troubles ostéo-musculosquelettiques : ostéoporose, cachexie
- Les troubles psychologiques : dépression, anxiété

Au regard de la grande prévalence des morbidités multiples chez les patients BPCO, la notion de vieillissement accéléré dans la maladie semble de plus en plus pertinente. Une récente étude a comparé 208 patients BPCO présentant des comorbidités multiples à 200 sujets présentant également des comorbidités multiples mais pas de BPCO.



Comorbidités identifiées objectivement



Nombre de comorbidité par patients

Figure 6 : Graphiques illustrant la fréquence et la nature de comorbidités identifiées chez les patients BPCO (haut) et la fréquence de patients présentant des comorbidités multiples (bas).

(Adaptée de Vanfleteren et al⁶³)

Dans cette étude, les auteurs ont cherché à évaluer deux éléments : confirmer les résultats d'une précédente étude sur un raccourcissement prématuré de la longueur des télomères chez les patients BPCO (marqueur du vieillissement/sénescence) et évaluer si ce raccourcissement des télomères était spécifique à un ou plusieurs sous-groupe(s) de patients⁶⁴. Bien que les auteurs n'aient pas montré de différence en fonction des sous-groupes de patients (*cluster*) répartis en fonction des comorbidités, ils ont confirmé un raccourcissement accéléré des télomères chez les patients. Ils ont également souligné un fait important : l'absence de *clusters* « psychologiques » et « cachectiques » dans le groupe non-BPCO, traduisant ainsi un déclin accéléré des fonctions de l'organisme chez les patients BPCO.

1.6.2. Atteinte musculaire :

On estime qu'environ 1 patient sur 3 souffre d'une atteinte musculaire^{63,65,66}. Elle se manifeste en général par une perte de masse musculaire conduisant à une perte de force et/ou d'endurance musculaire. La dysfonction musculaire n'est pas uniquement un handicap physique pour les patients, elle représente une réelle barrière dans l'accomplissement des gestes du quotidien, constituant ainsi un facteur important de la détérioration de la qualité de vie des patients, associée à un risque d'hospitalisation plus important^{67,68}. Bien que certaines études n'aient pas établi de lien entre la dysfonction musculaire et le niveau d'obstruction ou l'activité physique⁶⁹, d'autres études ont en revanche permis de relier la sévérité de la maladie et le déclin du VEMS, à l'atteinte musculaire^{70,71}.

De manière plus inquiétante, la dysfonction musculaire semble être un prédicteur indépendant de mortalité. En effet, les patients souffrant d'atrophie musculaire (évaluée en mesurant la surface de section du quadriceps par tomодensitométrie) présentent un taux de survie 4 fois plus faible que les patients ne présentant pas d'atteinte musculaire⁷². De même, un indice de masse maigre (IMM – évalué par impédancemétrie) <15 kg/m² pour les femmes et <16 kg/m² pour les hommes, a également été montré comme prédicteur indépendant de mortalité chez le patient BPCO⁷³. Enfin, en 2007, *Swallow et coll* ont mis en avant le caractère prédictif d'une baisse de la force musculaire sur la mortalité, en soulignant l'importance de leur approche non-invasive et sans radiation⁷⁴. A noter qu'il semblerait qu'il existe également un lien entre l'atrophie musculaire et le niveau de sévérité^{75,76}. L'ensemble de ces données indique que l'atteinte musculaire est élément prédicteur de la mortalité des patients BPCO, et souligne l'importance d'étudier les mécanismes mis en jeu dans les atteintes musculaires chez ces patients. (Figure 7)

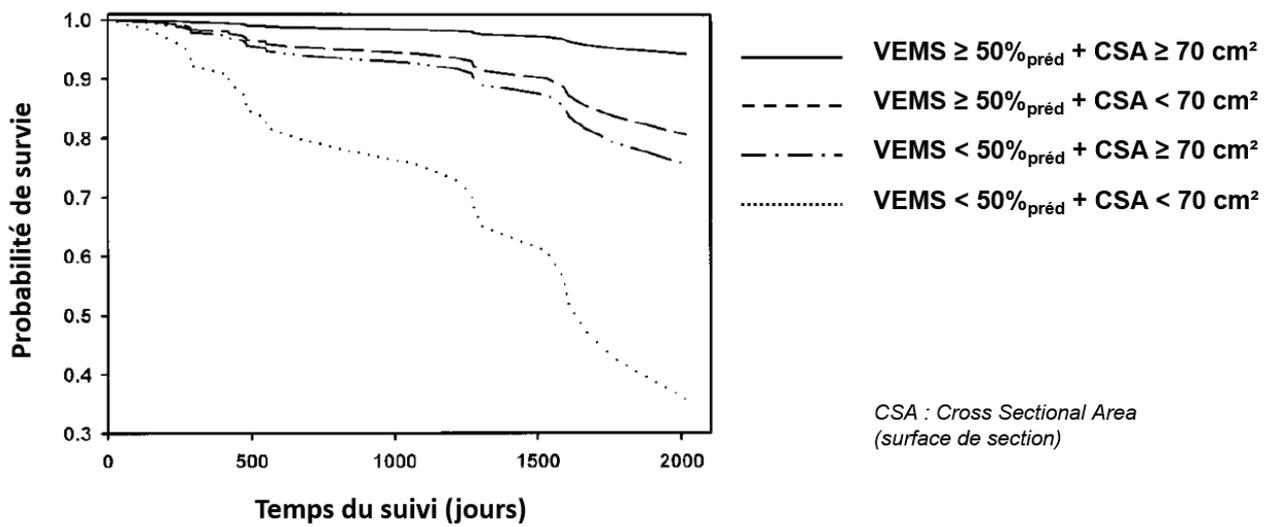


Figure 7a : Graphique du taux de survie en fonction du déclin de la fonction pulmonaire et de l'atrophie musculaire (adaptée de Marquis et al⁷²)

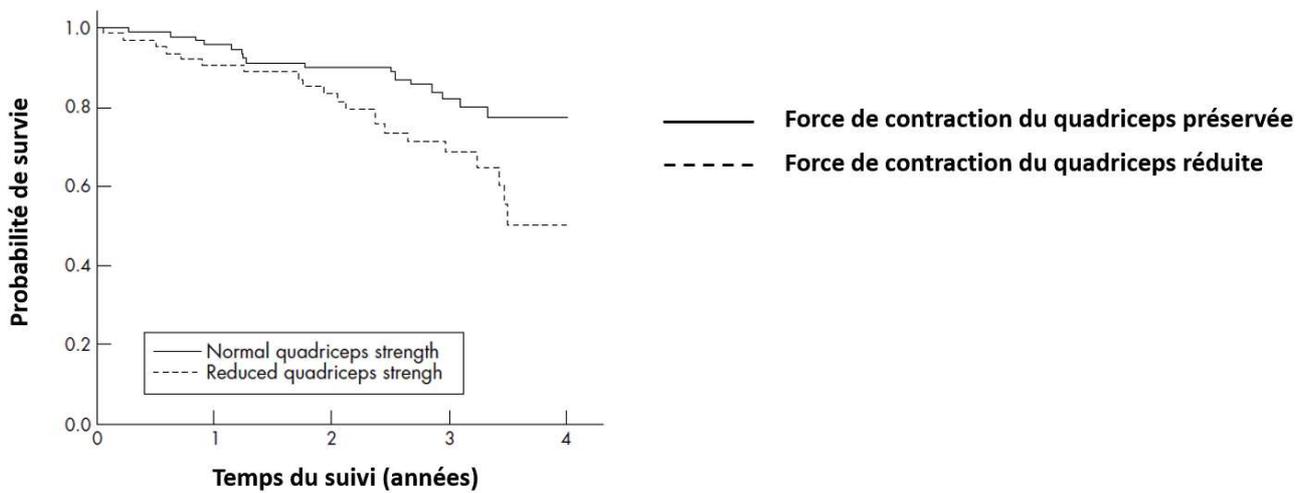


Figure 7b : Graphique du taux de survie en fonction de la force de contraction du quadriceps (adapté de Swallow et al⁷⁴)

Résumé

La BPCO est une maladie respiratoire fréquente qui est pourtant mal diagnostiquée. Elle est aujourd'hui la 3^{ème} cause de mortalité dans le monde.

Elle résulte de l'inhalation régulière de composés irritants comme ceux provenant de la fumée de tabac, de la pollution ou de la combustion de biomasses. L'apparition de la maladie est également influencée par des facteurs de risque génétiques, développementaux et environnementaux.

Enfin la BPCO se manifeste par une obstruction des voies aériennes menant à une réduction progressive et partiellement réversible des flux d'air bronchique. Cette obstruction est le résultat de phénomènes inflammatoires pulmonaires persistants et d'un remodelage structural pulmonaire.

Malheureusement, la BPCO est une maladie très hétérogène et complexe car la quasi-totalité des patients souffre également de comorbidités extra-pulmonaires détériorant d'autant plus leur qualité de vie. Parmi ces atteintes périphériques, la dysfonction musculaire est particulièrement handicapante et synonyme d'une réduction de l'espérance de vie.

2. La dysfonction musculaire dans la BPCO et limites thérapeutiques

2.1. Manifestations cliniques de la dysfonction musculaire chez le patient BPCO :

Le muscle squelettique est un tissu mou composé de fibres excitables leur permettant de se contracter en réponse à un stimulus électrique, chimique ou mécanique. Chaque unité motrice (composée d'un motoneurone et des fibres musculaires qu'il innerve) est alors capable de développer une force lors de la contraction, permettant ainsi d'effectuer un mouvement. Tout évènement pouvant altérer l'intégrité musculaire apparaît alors comme déterminant dans l'altération de sa fonction.

Chez le patient BPCO, la dysfonction musculaire peut se manifester tant au niveau des muscles respiratoires que périphériques, cependant les mécanismes impliqués diffèrent selon les groupes musculaires. Si le diaphragme des patients BPCO se caractérise par une adaptation à la fatigue⁷⁷, les muscles locomoteurs présentent 5 grandes modifications (Figure 8)⁶⁵ :

- L'atrophie musculaire, correspondant à une perte de masse musculaire
- La faiblesse musculaire, correspondant à l'incapacité d'un muscle à développer une force maximale en réponse à une résistance
- La perte d'endurance musculaire, correspondant à l'incapacité d'un muscle à maintenir une force sous-maximale en réponse à une charge fixe, que l'on peut subdiviser en 3 mécanismes :
 - o Un changement typologique (*shift*), correspondant à un déséquilibre dynamique de la proportion de fibres musculaires de type II (glycolytiques) par rapport aux fibres de type I (oxydatives)
 - o Une dysfonction mitochondriale, correspondant à une altération qualitative et quantitative de la fonction mitochondriale
 - o Une réduction des capacités oxydatives, correspondant à un déséquilibre entre la production et la consommation d'énergie à partir des substrats de la chaîne mitochondriale et la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS).

En revanche, bien que les muscles des membres supérieurs des patients BPCO semblent plus fatigables⁷⁸, leur force est généralement préservée comparée à celle des muscles des membres inférieurs⁷¹. L'ensemble de ces disparités d'adaptation suggère l'implication de facteurs locaux dans la dysfonction musculaire plutôt qu'une myopathie généralisée⁷⁹.

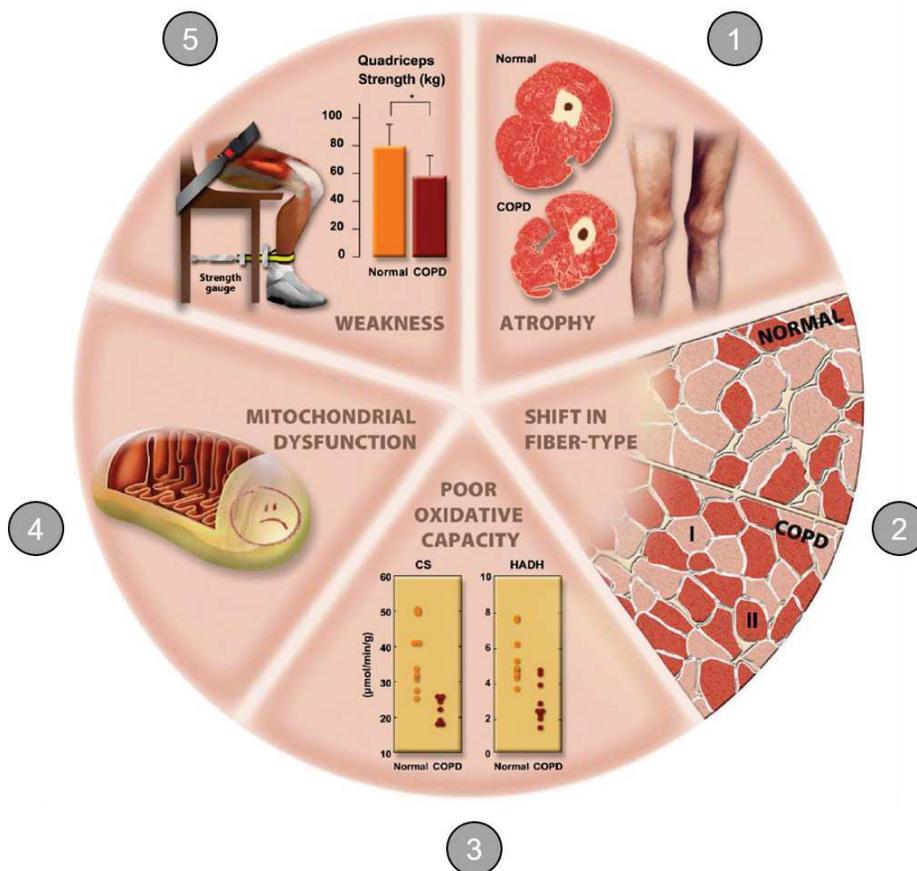


Figure 8 : Schéma des manifestations cliniques et cellulaires de la dysfonction musculaire chez le patient BPCO : (1) Atrophie, (2) Shift typologique, (3) Perte des capacités oxydatives musculaires, (4) Dysfonctions mitochondriales et (5) Faiblesse musculaire (Adapté de Maltais et al⁶⁵)

2.2. Implication de la perte de masse dans la dysfonction musculaire :

2.2.1. Rôle de la masse dans le déficit de force :

La perte de force musculaire, notamment au niveau des muscles des membres inférieurs, est un aspect important de la dysfonction musculaire chez le patient BPCO. On estime qu'en moyenne les patients présentent une perte de 20 à 30% de la force maximale volontaire du quadriceps, avec une perte annuelle d'environ 4,3%/an^{71,80}. Cette contrainte semble étroitement liée à la perte de masse musculaire et a un effet retentissant sur la qualité de vie et le taux de mortalité des patients⁸¹⁻⁸³. En effet, bien que l'implication de la perte de masse musculaire dans le déficit de la force musculaire soit qualifiée de « disproportionnée », elle semble malgré tout impliquée dans plus de 50% de la perte de force liée à la baisse d'activité (exemple : lors de séjours hospitaliers), ce qui place l'atrophie musculaire en tête de liste des cibles des interventions thérapeutiques^{66,84,85}.

2.2.2. Rôle de la masse dans le défaut d'endurance :

A l'inverse de la force, la réduction d'endurance musculaire chez les patients BPCO ne semble pas être due aux phénomènes atrophiques. En effet, le niveau d'endurance est principalement associé aux capacités oxydatives du tissu musculaire. Sans distinction du sexe ou de composition corporelle, les patients semblent souffrir d'une réduction de 32 à 77% d'endurance musculaire^{65,86,87}.

Cependant, l'hypothèse d'un mécanisme indirect par lequel l'atrophie musculaire réduirait les capacités oxydatives du tissu musculaire pourrait être envisagée. D'après certaines études, les fibres musculaires de type II seraient plus sensibles au développement d'une atrophie que les fibres de type I, ce qui pourrait induire une amplification du phénomène de *shift* typologique chez les patients atrophiques, afin de maintenir un équilibre fonctionnel entre les différents types de fibres au sein du muscle^{75,88}.

2.3. Régulation de la masse musculaire :

La masse musculaire est le reflet de l'état d'équilibre dynamique entre les processus de synthèse et de dégradation des protéines⁸⁹. Elle est également régulée par les phénomènes cellulaires associés à la régénération tissulaire.

2.3.1. La synthèse protéique :

La synthèse protéique est régulée par la voie des hormones/facteurs de croissance, dont la Protéine Kinase B (ou Akt) est un acteur majeur. Cette kinase très conservée chez les mammifères est impliquée dans de nombreuses fonctions clés de la cellule telles que le métabolisme, la survie et la prolifération⁹⁰.

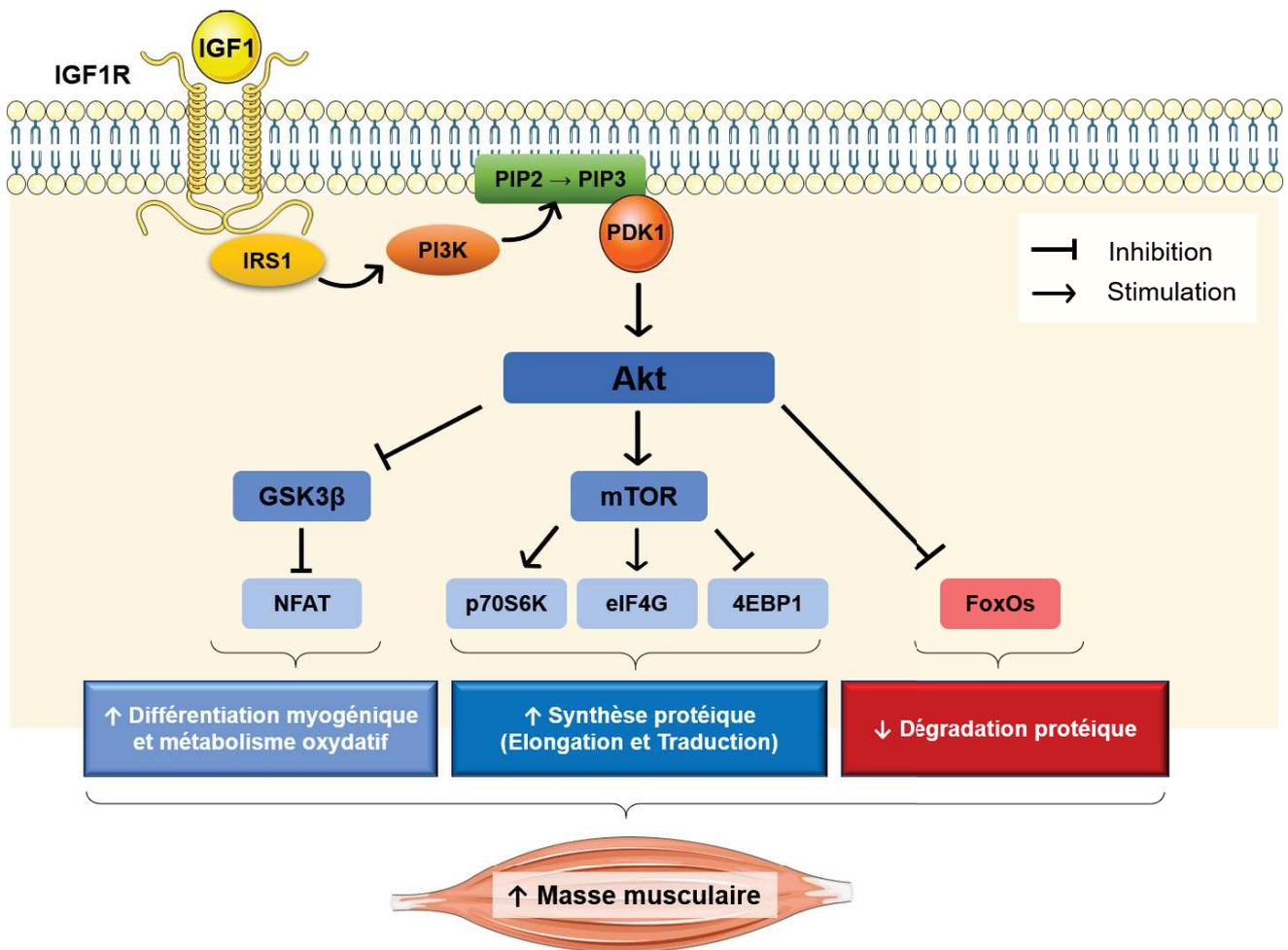


Figure 9 : Régulation de la masse musculaire par la voie de signalisation de la synthèse protéique IGF1/Akt

Dans le muscle, la voie de l'Insulin Growth Factor-1 (IGF-1) /Akt permet de stimuler à la fois la synthèse protéique tout en inhibant les voies de la dégradation. L'IGF-1, en se fixant sur son récepteur IGF1-R, active la fonction tyrosine-kinase du récepteur et entraîne son activation par trans-autophosphorylation. Cette activation permet le recrutement et la phosphorylation de l'Insulin Receptor Substrat (IRS) et de déclencher une cascade d'activation par phosphorylation de la phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K), de la phosphoinositide-dependent kinase 1 (PDK1) et d'Akt. Cette dernière activera la synthèse protéique en phosphorylant la mammalian target of rapamycin (mTOR), tout en levant l'inhibition exercée par la GSK-3 β (*glycogen synthase kinase-3 β*) sur le facteur myogénique NFAT (*Nuclear Factor Activated T-cells*)^{91,92}. (Figure 9)

2.3.2. La dégradation protéique :

La dégradation protéique est quant à elle régulée par trois voies : celle du protéasome qui met en jeu la famille des enzymes E3-ubiquitine-ligases⁹¹, celle des calpaïnes qui met en jeu des enzymes dont l'activité dépend du calcium⁹³ et celle de l'autophagie qui met en jeu la formation de vésicules de lyse intracellulaire (autophagosomes)⁹⁴.

Parmi les études employant les modèles d'atrophie (dénervation, dexaméthasone à forte dose, cytokines, immobilisation), quasiment toutes soulignent l'implication de l'expression des Muscle RING finger-containing protein 1 (MuRF1) et Muscle-specific ligase Atrophy F-Box protein (MAFbx aussi nommée Atrogin-1), toutes deux activées par le facteur de transcription NF κ B⁹⁵. Ces enzymes ont pour fonction de fixer un résidu ubiquitine terminal afin que les protéines marquées soient adressées au protéasome⁹¹. Le protéasome est quant à lui une super-structure cylindrique de 26S (*Svedberg* – unité de sédimentation) composée de deux sous-unités régulatrice 19S, qui détectent et acheminent les protéines marquées vers une sous-unité catalytique 20S. Ces enzymes et le protéasome constituent le système de dégradation ubiquitine-protéasome (UPS) (Figure 10).

Plusieurs évènements peuvent mener une protéine à être dégradée via le système ubiquitine-protéasome⁹⁶ :

- Contrôle qualité d'une protéine mal-conformée ou dégradée
- Régulation de la transcription
- Dégradation de peptide exogène pour présentation d'un antigène pour le système immunitaire
- Régulation de la composition cellulaire en protéine
- Besoin en acides aminés

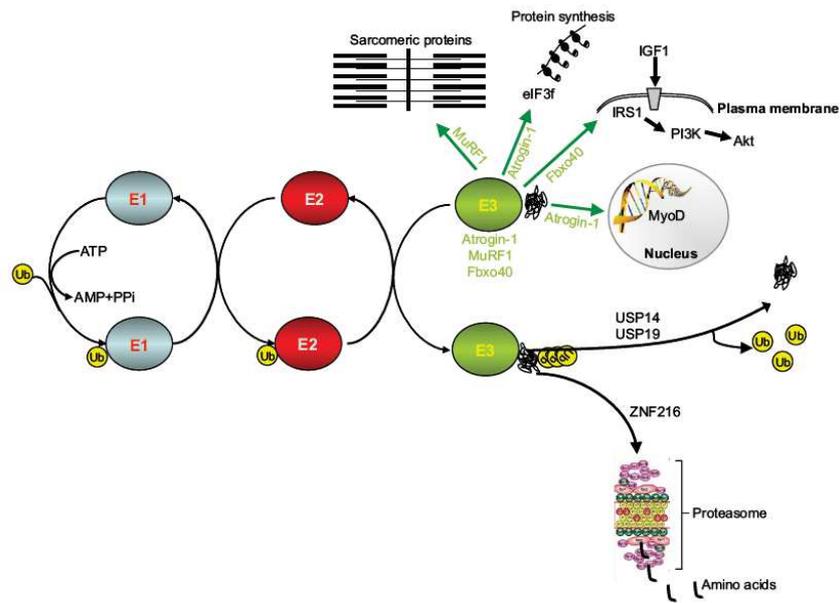


Figure 10a : Schéma d'action du système ubiquitine-protéasome dans l'homéostasie protéique du muscle squelettique⁹⁷

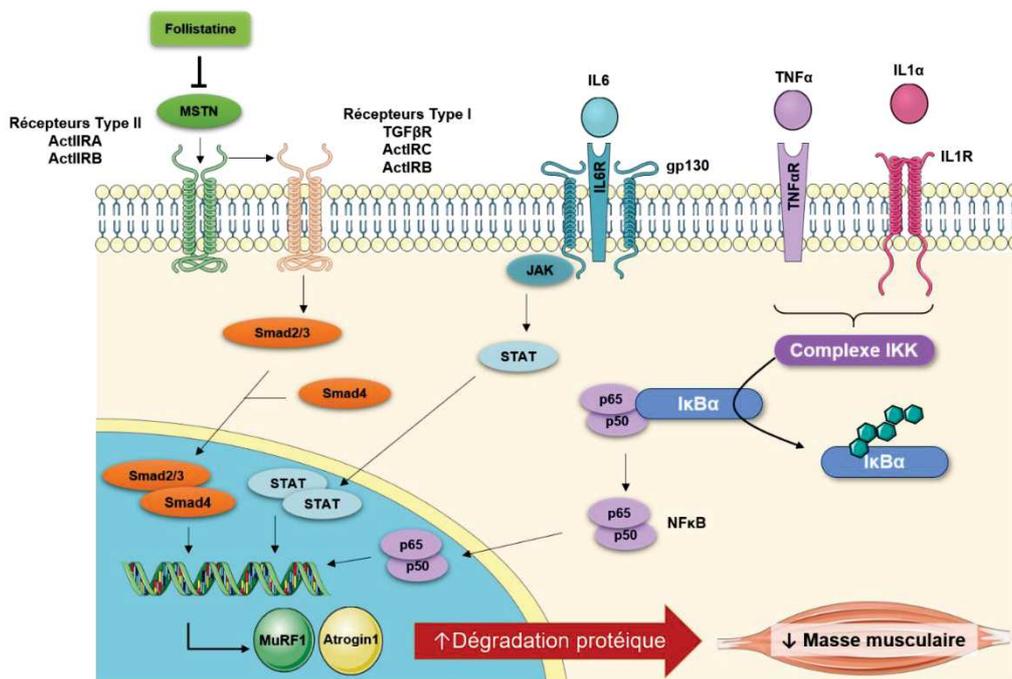


Figure 10b : Régulation de la masse musculaire par les principales voies de dégradation protéique activant le système ubiquitine-protéasome : la voie des myostatine, la voie des cytokines IL-6, TNF α et IL1 α (adapté de Miyamoto et al, 2016⁹⁸)

En parallèle, l'autophagie est la voie de dégradation impliquée dans le recyclage d'organites (macroautophagie) et de protéines cytoplasmiques par invagination de la membrane plasmique (microautophagie) ou par association avec une protéine-chaperonne (autophagie médiée par chaperonne)⁹⁴. En réponse à un stimulus, plusieurs complexes protéiques initient la mise en place d'une vésicule d'autophagie (autophagosome) autour du matériel biologique à dégrader⁹⁹. Une fois l'autophagosome formé, celui-ci fusionne avec une vésicule lysosomale (autolysosome) afin que le contenu soit digéré. La restriction nutritionnelle est le stimulus le plus étudié induisant les mécanismes d'autophagie. Cependant, elle peut également être induite par des stress physiologiques (hypoxie, haute température, stress du réticulum-endoplasmique...), par stimulation hormonale et pharmacologique ou encore par activation du système immunitaire⁹⁴. Les méthodes modernes d'analyse de l'autophagie consistent à quantifier le flux de vésicules (flux autophagique) à travers la quantification de protéines clés telles que SQSTM1/p62 ou à travers le clivage de LC3⁹⁴. (Figure 11)

2.3.3. Autres mécanismes impliqués dans la régulation de la masse :

En parallèle de ces deux voies moléculaires, d'autres processus cellulaires peuvent moduler la masse musculaire : la régénération, l'apoptose et la sénescence.

La régénération musculaire fait intervenir l'activation de cellules souches résidentes musculaires appelées cellules satellites¹⁰⁰. A l'état basal, les cellules satellites sont quiescentes et disponibles pour répondre à un stimulus de lésion/trauma physique ou de croissance. Une fois activée, les cellules satellites (appelées myoblastes à cette étape) vont proliférer de deux manières :

- Symétrique : afin d'amplifier le nombre de cellules participant à la régénération du tissu endommagé. Pour cela les deux cellules issues de la division proliféreront à leur tour, donnant ainsi deux nouvelles cellules proliférantes, jusqu'à interruption du programme de division.
- Asymétrique : afin de maintenir une réserve de cellules satellites quiescentes dans le tissu, et disponibles en prévision de futur besoin de régénération. Pour cela à l'issue de la première division, l'une des deux cellules formées préservera un programme cellulaire lui permettant de revenir à l'état quiescent.

Les myoblastes ainsi engendrés entreront dans une phase de différenciation durant laquelle ils fusionneront (ensemble ou avec les fibres musculaires environnantes) afin de remplacer le tissu endommagé et de participer à la croissance musculaire¹⁰¹.

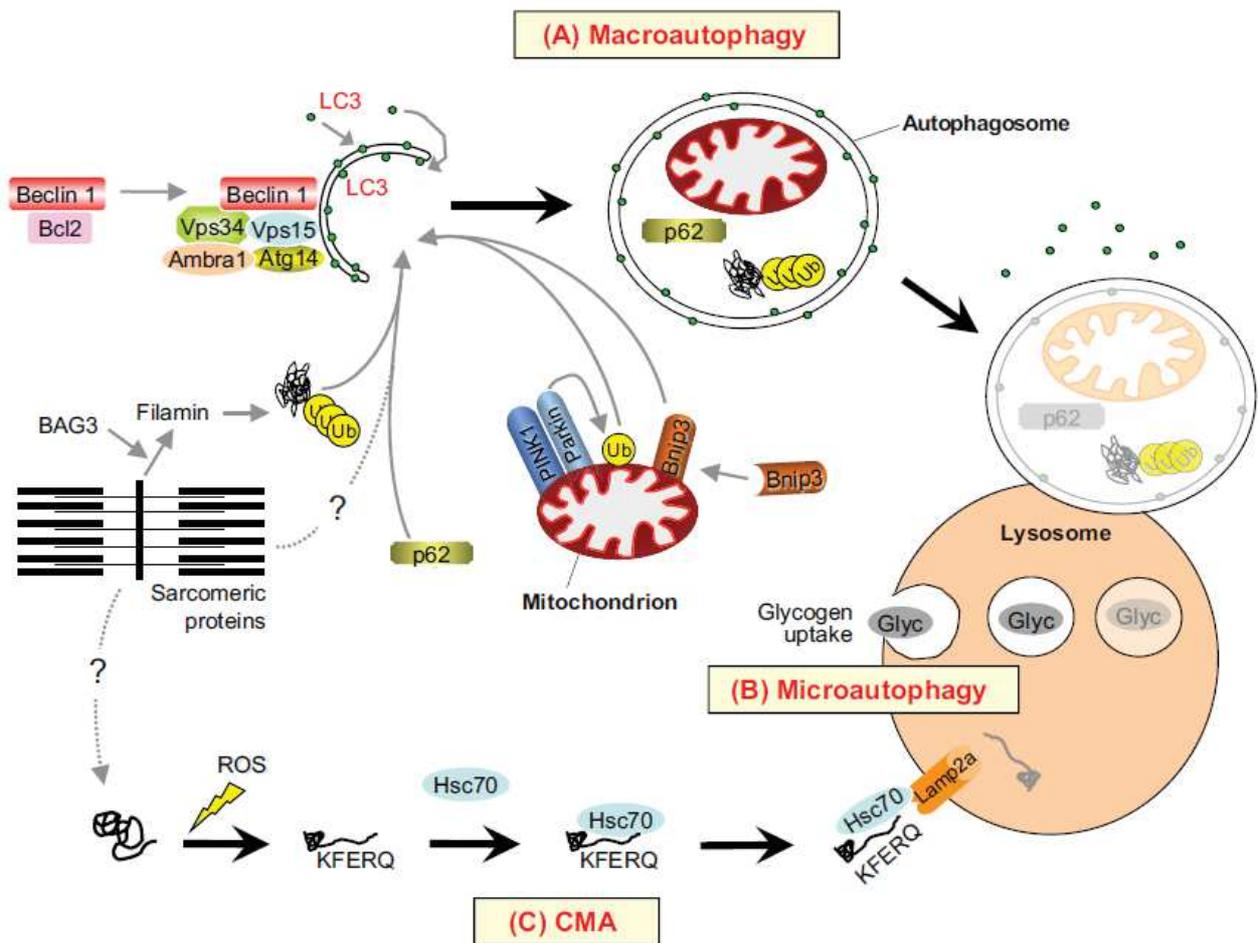


Figure 11 : Schéma global de (A) la macroautophagie, (B) la microautophagie et (C) l'autophagie médiée par les protéines-chaperonnes et leur contribution dans la dégradation protéique et le recyclage des organites dans le muscle squelettique⁹⁷

L'apoptose musculaire est un phénomène encore incertain au regard de la littérature controversée. Dans le cadre du vieillissement, des études *in vitro* sur le nombre de divisions cellulaires semblent indiquer que ni le nombre de cellules satellites, ni leur potentiel myogénique ne semblent être altérés et que l'apoptose ne serait restreinte qu'à des conditions pathologiques particulières telles que la dénervation, le déconditionnement, le cancer et l'ischémie¹⁰¹⁻¹⁰³.

Ces observations ont cependant été modérées par les études montrant un impact négatif du vieillissement sur la niche cellulaire. En effet, cette zone anatomique et fonctionnelle normalement garante de la préservation des fonctions d'une cellule souche, semble être altérée au cours du vieillissement, entraînant une réduction des capacités des cellules satellites à retourner à l'état quiescent. Ceci se traduit au cours du temps par un affaiblissement progressif du *pool* de cellules satellites disponibles¹⁰⁴⁻¹⁰⁶.

Des études menées chez la souris ont également soulevé l'hypothèse d'un changement de programme de différenciation musculaire au cours du vieillissement menant les cellules à adopter un phénotype fibroblastique, notamment *via* l'activation de la voie Wnt¹⁰⁷. Ces observations ont été récemment nuancées par les résultats montrant que les souris dont les muscles squelettiques ont été déplétés de cellules satellites très tôt dans l'âge adulte, ne présentaient aucun signe d'atrophie musculaire avancée au cours du vieillissement. Cependant, ces souris présentaient une fibrose accrue, suggérant ainsi un rôle régulateur de la cellule satellite sur la fibrose au cours du temps¹⁰⁸.

2.4. Régulation de la masse musculaire dans la BPCO :

2.4.1. Dégradation protéique dans la BPCO :

La perte de masse est une des caractéristiques cliniques de la dysfonction musculaire observée dans la BPCO et correspond à une dérégulation d'un ou plusieurs des processus physiologiques présentés ci-dessus^{109,110}.

Concernant la dégradation protéique, la majorité des études s'accorde à dire qu'elle semble suractivée dans les muscles squelettiques de patients BPCO, tant par la voie UPS, que par la voie de l'autophagie^{111,112}. Les enzymes MuRF1 et Atrogin1 ont été montrées comme étant sur-exprimées dans les muscles de patients cachectiques ou durant une exacerbation^{75,113,114}, tandis que seulement Atrogin1 semblait présenter des niveaux d'ARN_m et protéiques augmentés dans les muscles de patients atrophiés^{115,116}. En accord avec ces profils d'expressions modifiés, les facteurs régulateurs de ces enzymes, FoxO-1

et FoxO-3 ainsi que NF- κ B, ont été retrouvés augmentés chez les patients cachectiques et atrophiés ^{114,117}.

En parallèle, un excès de vésicules d'autophagosomes a été relevé dans les muscles *vastus lateralis* et *tibialis anterior* de patients BPCO, accompagné d'une surexpression de protéines liées à l'autophagie¹¹⁸. En effet, de nombreuses protéines impliquées dans l'initiation de vésicules telles que PI3KCIII et Atg7, présentaient des taux 2 à 3 fois supérieurs à ceux trouvés dans les muscles de sujets contrôles. Une étude sur une protéine adaptatrice telle que SQSTM1/p62 a également montré des niveaux d'ARN_m et protéiques augmentés dans les muscles de patients BPCO. Des récentes études *in vitro* ont pu corroborer ces observations, notant une surexpression de SQSTM1/p62 dans les myoblastes issus de patients BPCO, associée à une augmentation du flux autophagique¹¹⁹.

2.4.2. Synthèse protéique dans la BPCO :

En revanche, la question de l'état d'activation de la synthèse protéique dans les muscles de patients BPCO reste, quant à elle, encore indécise. Bien que certaines études aient pu montrer une réduction de l'expression de l'IGF-1 dans le muscle de patients cachectiques ¹¹⁷, ainsi qu'une diminution de l'expression des protéines sous-jacentes de la voie, telles que p70S6K phosphorylé ^{118,120}, cela ne semble pas être une observation systématique. En effet, d'autres études n'ont relevé aucune modification de la voie de la synthèse protéique¹¹⁶, et certaines ont même constaté une suractivation de la voie, avec une augmentation du ratio pAkt/Akt^{114,117} ou de la transcription d'IGF-1¹²¹. Ces résultats suggèrent une grande hétérogénéité concernant l'état d'activation des voies de synthèse protéique.

Cette hétérogénéité pourrait également traduire une activation persistante des voies de synthèse protéique pour contrebalancer la suractivité des processus anaboliques, afin de maintenir la masse musculaire. Dans ce sens, *Kneppers et coll* ont mis en évidence une suractivité des deux processus conjointement, suggérant un recyclage (*turn-over*) protéique anormal dans le muscle BPCO¹²². Ainsi, ces mécanismes induiraient un phénomène de remodelage musculaire susceptible d'entraîner un « épuisement » des processus de régénération musculaire, menant à terme à une atrophie et à une dysfonction musculaire¹¹⁰.

2.4.3. Régénération, apoptose, sénescence dans la BPCO :

Bien que le nombre de cellules satellites semble inaltéré chez le patient BPCO, il est possible qu'un épuisement du potentiel myogénique des muscles, par un état de sénescence précoce soit envisageable chez les patients BPCO. En effet, *Thériault et coll* ont fait l'observation dans les fibres musculaires de patients à masse musculaire préservée

d'une activation des processus de régénération musculaire (plus grande proportion de fibres musculaires avec noyaux centraux) avec une longueur télomérique préservée. A l'inverse, les patients atrophiques présentaient une proportion de fibre à noyaux centraux comparable au groupe contrôle avec une réduction de la longueur des télomères. Ces résultats suggérant un *continuum* menant à un phénomène d'atrophie résultant d'un épuisement des capacités régénératives¹²³. Cette équipe a confirmé l'existence de défauts de régénération musculaire dans les myoblastes en culture issus de patients¹²⁴. Plus récemment, une autre équipe a rapporté que les patients BPCO atrophiques avaient également tendance à présenter une élévation de CDKN2a (ou p16^{INK4a}) connue pour être un marqueur de sénescence¹²⁵. L'ensemble de ces résultats suggérant un état de vieillissement accéléré des muscles de patients BPCO pouvant altérer les processus de régénération. A noter que cette étude montrait également une diminution du marqueur γ H2AX, qui est un indicateur de réparation de l'ADN. Si cette équipe interprétait cette réduction comme une marque précoce de sénescence, elle est également le signe d'une activation des processus apoptotiques.

Bien que peu d'études se soient intéressées à ce mécanisme dans la BPCO, il semblerait que les dégâts à l'ADN soient le signe d'une apoptose musculaire, ce qui, dans une cellule polynucléée telle que le myocyte, ne conduit pas à la mort cellulaire mais à une atrophie accompagnée d'une réduction du nombre de noyaux par fibre¹²⁶. Dans ce sens, un niveau plus important de protéine PARP clivée a été observé chez des patients présentant une réduction de l'IMC ainsi qu'une augmentation du nombre de cellules apoptotiques (positives au marquage TUNEL)¹²⁷. *Barreiro et coll* ont également montré que les muscles diaphragmatique et squelettiques de patients présentant une obstruction bronchique importante présentaient un nombre de cellules en apoptose plus important, en parallèle d'une baisse de force maximale volontaire¹²⁸. Ces résultats confortent l'existence de phénomènes d'atrophie par apoptose dans les muscles de patients BPCO.

Suite à l'activation et à la prolifération des cellules satellites, le processus de régénération nécessite une étape de différenciation, correspondant à l'acquisition d'un phénotype musculaire mature. Cette étape est gouvernée par un programme séquentiel de différenciation dont les principaux acteurs myogéniques sont MyoD, Myf5 et myogénine. Plusieurs études ont décrit des niveaux d'expression de MyoD et myogénine diminués chez les patients tant au niveau de la transcription qu'au niveau protéique^{75,117}. L'exercice physique a cependant permis de révéler une réponse myogénique chez les patients de

composition corporelle normale comparable aux sujets contrôles, avec une augmentation de MyoD tant au niveau ARN_m que protéique¹²⁹.

D'autres études n'ont en revanche pas constaté de différence d'expression des marqueurs myogéniques, mais ont noté une nette augmentation de l'expression d'un autre modulateur de la croissance musculaire : la myostatine (MSTN)¹¹⁶. La MSTN est une myokine de la famille des *Transforming Growth Factor β* (TGFβ), impliquée dans la modulation de la régénération/croissance musculaire par l'inhibition de la prolifération des cellules satellites et de leur différenciation¹³⁰. Produits par le muscle, l'expression des ARN_m de la MSTN est augmentée dans les muscles de patients BPCO atrophiques et hypoxémiques et inversement corrélée à la force développée par des patients avec un IMM <16 kg/m²^{116,131,132}. Ces résultats suggèrent également des altérations des processus de différenciation musculaire chez les patients BPCO.

2.5. Etiologies de la perte de masse musculaire :

Plusieurs facteurs étiologiques de l'atrophie musculaire ont été identifiés dans la BPCO : l'inactivité, la malnutrition, l'inflammation, le stress oxydant, l'hypoxémie/hypercapnie et la médication en corticostéroïdes en sont les principaux^{65,111,133}. D'une manière similaire à la question de l'âge dans la prévalence de la BPCO, la question de la dysfonction musculaire est-elle juste le reflet d'un déconditionnement musculaire résultant d'une longue période d'inactivité/sédentarité ou est-ce plutôt le concours de plusieurs facteurs étiologiques imbriqués ? Cette partie propose de revenir sur les différents éléments permettant de répondre à cette question.

2.5.1. La réduction d'activité physique :

La réduction de l'activité physique quotidienne est une caractéristique fréquente chez le patient BPCO, indépendamment de la sévérité de la maladie^{134,135}. Ce déficit d'activité n'est pas rare et touche également les patients présentant une BPCO de sévérité modérée, cependant l'inactivité/sédentarité est le point de départ d'une « spirale descendante » menant à une intolérance à l'effort chez le patient. En général, les difficultés respiratoires poussent les patients à limiter les situations susceptibles de générer chez eux un état de stress respiratoire, limitant ainsi leur niveau d'activité. Cependant, cette baisse d'activité favorise en contrepartie l'apparition de troubles musculaires à l'effort, même pour de faible intensité. Ces troubles fonctionnels (réduction de masse, force) et métaboliques (baisse des capacités oxydatives, *shift* typologique) entraînent une élévation de la production de CO₂ par le métabolisme au cours de l'effort, se répercutant par une acidose et une hypercapnie

toutes deux susceptibles d'entraîner une élévation de la charge ventilatoire¹³⁶. Ainsi, l'hyperventilation chez le malade obstructif va notamment avoir pour impact d'entraîner une hyperinflation dynamique au cours de l'effort et contribuer à la sensation de dyspnée. De nouveau, ces troubles respiratoires vont inciter les patients à réduire leur niveau d'activité¹³⁷⁻¹⁴⁰ (Figure 12).

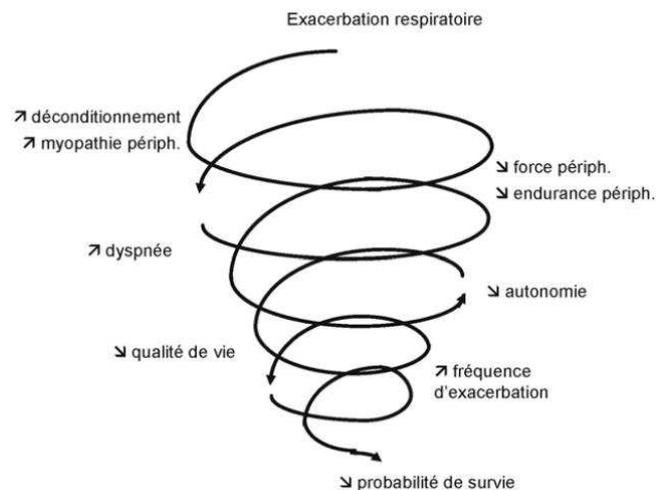


Figure 12 : Spirale de l'exacerbation respiratoire et de la baisse du niveau d'activité menant à une réduction de la qualité et de l'espérance de vie chez le malade respiratoire chronique¹⁴¹

Cette atrophie induite par une baisse d'activité est un phénomène physiologique largement documenté, notamment en réponse à des alitements prolongés lors d'hospitalisation ou résultant d'une exposition à un environnement en microgravité comme lors de voyages spatiaux. Au niveau moléculaire, l'inactivité entraîne la mise en place d'une nouvelle dynamique de synthèse et de dégradation protéique⁹⁵. Bien que les méthodes expérimentales pour modéliser l'inactivité peuvent différer, les récents résultats suggèrent que l'inactivité provoque une diminution de la synthèse protéique et une augmentation transitoire de la dégradation protéique¹⁴².

En effet, chez des sujets sains ayant suivi un alitement de 21 à 28 jours, le taux de synthèse protéique semble être altéré, sans qu'une supplémentation en acides aminés ou l'application d'une gravité artificielle ne puisse totalement contrebalancer ce phénomène^{143,144}. De même, une immobilisation de la jambe durant 21 jours semble également entraîner une réduction de la synthèse protéique sans modification à long terme de la dégradation¹⁴⁵. Les auteurs ont d'ailleurs souligné une augmentation de l'expression

de MuRF1 dans les premiers jours de l'immobilisation, puis une diminution, entraînant un retour à un niveau basal de dégradation protéique en fin de protocole. Cette cinétique a également été observée sur un protocole d'immobilisation de la jambe durant une période plus courte de 14 jours¹⁴⁶.

Suetta et coll en 2012 ont également montré que l'âge avait un rôle important dans la modulation des effets induits par l'immobilisation. En effet, l'expression d'Atrogin1 et MuRF1 à 14 jours s'avérait être significativement réduite par rapport au niveau pré-immobilisation chez les sujets âgés alors qu'elle était inchangée chez les sujets jeunes¹⁴⁷. En revanche, les auteurs ont mis en évidence une baisse des capacités anti-oxydantes après alitement indépendamment de l'âge^{147,148}. Enfin, malgré le fait que l'inactivité induise un *shift* typologique, la dégradation des filaments d'actine et de myosine semble homogène entre les différents types de fibres, ce qui indique que les processus d'hypercatabolisme n'affectent pas la proportion des différents types de filaments au sein des fibres musculaires, indiquant une préservation de la fonction musculaire malgré la transition métabolique^{148,149}.

Cependant, il semble que l'ensemble de ces résultats relatifs à la baisse d'activité ne permet pas d'expliquer l'intégralité des altérations musculaires retrouvées chez les patients BPCO. D'une part, la cinétique d'expression de MuRF1 et Atrogin1 est différente entre les deux conditions. Alors que l'expression de ces enzymes est rapidement induite par immobilisation, puis retourne à un niveau d'expression basale, chez les patients la surexpression de ces enzymes semble persistante. D'autre part, l'expression de ces enzymes est liée à la signalisation dépendante des protéines FoxOs et NFκB, dont les variations d'expression semblent discordantes avec les études sur l'immobilisation^{150,151}. En effet, alors que l'hypercatabolisme induit par l'immobilisation passe par l'activation des FoxOs et la répression de la voie IGF1/PI3K/Akt simultanément^{150,152}, plusieurs équipes ont observé une suractivation de la voie IGF1/Akt dans les muscles de patients BPCO^{114,116}. De même, l'atrophie dépendante de la baisse d'activité fait intervenir les sous-unités p50 et Bcl-3 du facteur NFκB, et non l'hétérodimère p50/p65 (RelA) qui est plutôt associé à la dégradation protéique médiée par une réponse immunitaire^{111,151}.

Enfin, dans le cadre de la réhabilitation respiratoire (RR), bien que cette notion soit débattue^{153,154}, un pourcentage important de patients semble « non-répondeurs » aux effets bénéfiques de l'exercice physique dispensé *via* un réentraînement à l'effort (REE). Ceci suggère donc que des éléments inhérents à la pathologie détériorent la fonction musculaire à plus long terme, compromettant les effets bénéfiques du REE indépendamment de la baisse d'activité.

2.5.2. Malnutrition/dénutrition :

De manière analogue au déséquilibre entre les voies de dégradation et de synthèse, la dénutrition (ou malnutrition) est le résultat d'un déséquilibre en faveur de la dépense énergétique au détriment de l'apport énergétique pouvant participer aux mécanismes d'atrophie musculaire. L'atrophie liée à la dénutrition semble toucher près d'un tiers des patients et peut être causée par un déficit d'apport calorique, chez les patients stables et également lors des périodes d'exacerbations¹⁵⁵. On constate notamment que cette atrophie est associée à des phénomènes d'hypoxie, d'inflammation ainsi qu'à une élévation de la leptine circulante^{156,157}. De manière paradoxale, alors qu'une période de jeûne ou de restriction calorique est d'abord marquée par une diminution de la masse grasse puis du tissu musculaire, chez une partie des malades c'est préférentiellement la masse musculaire qui semble touchée⁷³. Le muscle étant un grand réservoir de protéines, celui-ci va donc grandement participer au maintien de l'équilibre énergétique en fournissant à l'ensemble de l'organisme l'apport calorique nécessaire sous forme d'acides aminés¹⁵⁸.

Cependant, chez les patients sévères au repos, il semble tout de même plus fréquent que l'atrophie soit liée à un excès de dépense énergétique¹⁵⁹⁻¹⁶¹. Au repos comme à l'exercice, les patients présentent un manque d'efficacité mécanique ainsi qu'une consommation exacerbée d'ATP^{162,163}. A noter que ce déséquilibre énergétique pourrait également être aggravé par le *shift* typologique. En effet, le *shift* typologique traduit également un *shift* métabolique pour le muscle malade, voyant ainsi ses capacités glycolytiques augmentées au détriment de ses capacités oxydatives. Non seulement la quantité d'ATP et de phospho-Créatine (PCr) musculaires au repos sont réduites chez les patients BPCO, mais leurs capacités de régénération des stocks énergétiques semblent également altérées^{164,165}. Ces résultats vont dans le sens d'une diminution de la densité et du fonctionnement des enzymes mitochondriales chez les sujets cachectiques ou présentant un faible IMC¹⁶⁶⁻¹⁶⁸. De manière intéressante, *Remels et coll* observaient en 2010 que les patients présentant un IMC plus faible et une réduction des facteurs de transcription mitochondriaux PPAR- α , TFAM et PGC1- α , présentaient également des niveaux anormalement élevés de *Tumor Necrosis Factor* (TNF)- α , suggérant que les troubles de la composition corporelle pourraient être médiés par l'inflammation musculaire entraînant ainsi des désordres dans la régulation énergétique¹⁶⁹.

2.5.3. Glucocorticoïdes :

Le corps produit de manière circadienne des hormones stéroïdiennes régulant divers processus dans l'organisme. Parmi ces hormones, les glucocorticoïdes (GC) – la cortisone et le cortisol – ont des effets « génomiques » ou « non-génomiques » via leur liaison à leur récepteur (GR). On qualifie de « génomiques » les effets induits par la liaison du complexe GC-GR à l'ADN sur des zones régulatrices de la transcription d'autres gènes, et de « non-génomiques » les effets modulateurs du complexe GC-GR par interaction directe avec des protéines cibles. Parmi les effets induits par les GC, les effets anti-inflammatoires et analgésiques sont les plus utilisés dans le traitement des symptômes des patients les plus sévères. Cependant, du fait de leurs fonctions physiologiques répressives, les GC peuvent induire en cas de surdosage des phénomènes de résistance s'accompagnant d'effets secondaires pro-atrophiques au niveau des muscles squelettiques^{170,171}.

Les GC ont une action conjointe sur le muscle en inhibant la synthèse protéique et en favorisant la dégradation protéique. Par une action « non-génomique », les GC inhibent la signalisation IGF1 par interférence avec le complexe IRS-PI3K, ce qui a pour double effet de dé-réprimer les FoxOs et de bloquer l'activité de mTOR¹⁷²⁻¹⁷⁴. En parallèle, par une action « génomique », les GC favorisent la transcription de REDD1 qui est un répresseur des acteurs en amont et en aval d'Akt, tout en favorisant l'expression des enzymes MuRF1 et Atrogin1, ainsi que la MSTN¹⁷⁵⁻¹⁷⁷.

Bien que peu d'études aient pu montrer un lien de causalité entre l'expression de ces gènes pro-atrophiques et l'utilisation de GC, la question de leur efficacité dans la BPCO est cependant débattue. En effet, malgré des effets anti-inflammatoires indéniables, leur utilisation semble malheureusement associée à un plus haut taux de mortalité^{178,179}. Chez les patients hypoxémiques, seul REDD1 a été retrouvé surexprimé au niveau musculaire, corroborant les études montrant que l'hypoxie induit la production de GC et pourrait ainsi expliquer une partie de l'atrophie musculaire induite par les GC^{180,181}.

2.5.4. Hypoxémie / Hypercapnie

L'hypoxémie correspond à une réduction de la quantité d'oxygène transportée dans le sang. Elle est une conséquence évidente d'une dysfonction pulmonaire, dont la prévalence chez les patients BPCO reste encore à ce jour difficile à estimer. Si l'étude UPLIFT (menées chez 5993 patients) avait permis d'évaluer la prévalence de l'hypoxémie à 2% de cette population de patients, il semblerait que plus de 80% des patients à un stade avancé de la maladie inclus dans l'étude du *National Emphysema Treatment Trial* utilisaient une forme d'oxygéno-thérapie¹⁸²⁻¹⁸⁴. De plus, le rôle de l'hypoxémie au niveau musculaire

étant encore difficile à étudier, son implication dans la fatigue musculaire des patients BPCO est principalement suggérée par les études menées chez des sujets sains ou des modèles expérimentaux¹¹¹.

Majoritairement étudiée chez l'Homme par des séjours en haute altitude, l'atrophie musculaire lié à l'hypoxémie est en partie imputable à une inhibition des comportements de prise alimentaire^{185,186}. La leptine, aussi appelée hormone de la satiété, est produite de manière circadienne dans l'organisme, et peut également être modulée par le facteur inductible par l'hypoxie (HIF1 α)¹⁸⁷. Le cycle circadien de production de leptine ayant été retrouvé modifié chez des patients hypoxémiques ou durant une phase d'exacerbation, il est possible que par ce mécanisme, l'hypoxie induise une réduction concomitante des processus de prise alimentaire et des mécanismes nécessitant de l'énergie, tels que la synthèse protéique^{156,188,189}.

D'autre part, indépendamment de l'effet hypophagique, l'hypoxie régule de manière directe la signalisation de la synthèse protéique, en modulant l'activité de mTOR par la voie AMPK/TSC2/Rheb, ainsi que par l'activation de REDD1, également responsable de la phosphorylation de TSC2. L'activation de ces deux voies de signalisation résulte en une baisse de l'activité traductionnelle de p70S6K et 4E-BP1^{181,190}. A l'inverse de l'hypoxie chronique, les mécanismes impliqués au cours d'une hypoxie aiguë ne semblent pas nécessairement altérer la synthèse protéique. En effet, *d'Hulst et coll* ont décrit une augmentation de l'expression de REDD1 en réponse à une hypoxie de 4 heures chez des sujets sains, qui s'accompagnait également d'une augmentation de la synthèse protéique¹⁹¹. (Figure 13)

A l'image de l'impact de l'inactivité sur la masse musculaire, il semblerait que l'hypoxie induise un déséquilibre en faveur de la dégradation protéique, accompagnée d'une augmentation des dégâts liés au stress oxydant. En effet, plusieurs études *in vitro* et *in vivo* ont constaté une augmentation conjointe de la quantité de protéines ubiquitinées/carboxylées, de l'activité de dégradation des enzymes calpaïnes et chymotrypsine-like, de l'expression de MuRF1 et Atrogin1 et de l'expression de HIF1 α ¹⁹²⁻¹⁹⁴. *Jatta et coll* ont d'ailleurs montré que cette surexpression de HIF1 α est associée à l'expression de la protéine de von Hindel-Lindau, une E3-ligase spécifique chargée de réguler la quantité de HIF1 α dans les cas de surexpression pathologique, comme lors d'une hypervascularisation oncogénique¹⁹⁵.

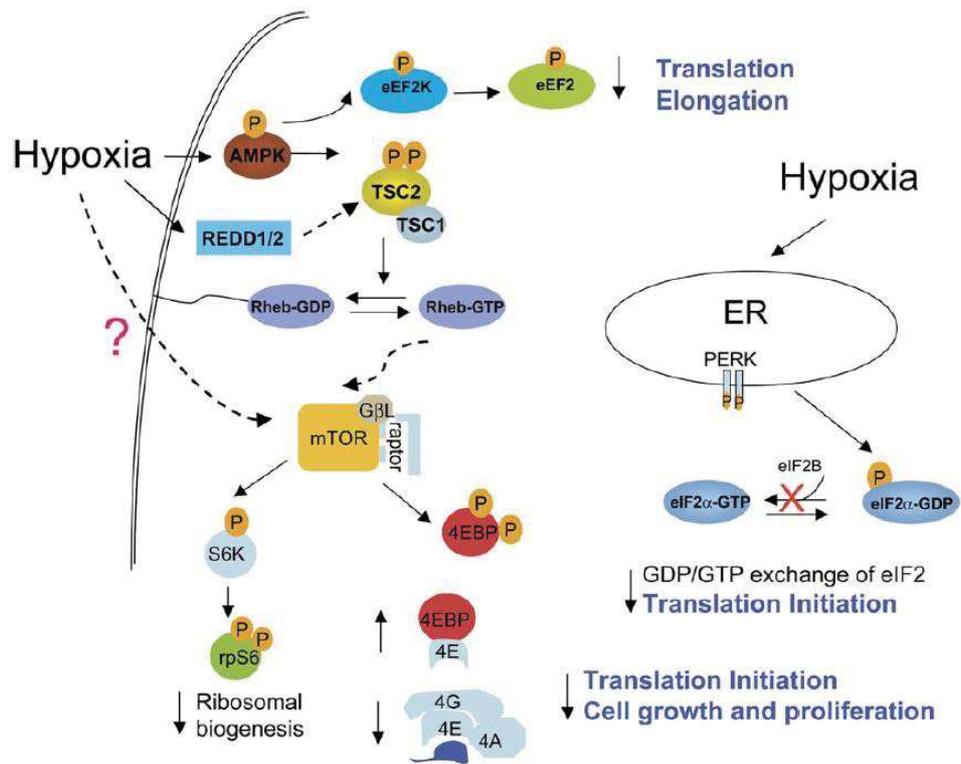


Figure 13 : Schéma de l'inhibition par l'hypoxie de la synthèse protéique par la voie AMPK/TSC2/Rheb¹⁹⁰

En revanche, peu d'études se sont intéressées à la question de l'autophagie induite par l'hypoxie. De manière surprenante, une étude récente visant à discerner les phénomènes d'atrophie dépendants de l'hypoxie de ceux dépendants du jeûne, a montré que l'hypoxie prévenait les phénomènes d'autophagie induite par le jeûne¹⁹⁶. Malgré une perte de masse musculaire plus importante, les souris en condition hypoxique présentaient une augmentation moins importante de l'expression de la protéine initiateur p-ULK1 induite par la restriction alimentaire comparativement aux souris en normoxie.

En parallèle, ces souris en condition hypoxique présentaient également une augmentation moins importante des protéines impliquées dans la mitophagie (BNIP3 et MAP1LC3B), avec une abolition de l'activation de la voie AMPK, ce qui pourrait traduire un effet protecteur de l'hypoxie comme cela avait déjà été suggéré dans les cellules tumorales^{197,198}. Ce processus pourrait notamment limiter la déstabilisation du réseau mitochondrial au détriment de l'homéostasie protéique. Ainsi, l'atrophie musculaire plus importante chez les souris en condition d'hypoxie pourrait s'expliquer par une amplification des déséquilibres de la dynamique des voies de synthèse et de dégradation protéique¹⁹⁶. Il reste cependant important d'identifier plus précisément les signatures moléculaires spécifiques de l'hypoxie afin de pouvoir définitivement les imputer aux mécanismes d'atrophie liés à la BPCO.

2.5.5. Stress oxydant/nitrosatif :

De manière constitutive, les cellules produisent à partir du métabolisme de l'oxygène des seconds messagers de faible durée de vie appelés « espèces réactives de l'oxygène » (ROS – *Reactive Oxygen Species*)¹⁹⁹. L'origine des ROS peut être le résultat d'une exposition aux UV, aux radiations ionisantes et/ou à des toxines de l'environnement (origine exogène) ou le résultat du fonctionnement de la cellule (origine endogène). L'origine des ROS endogènes étant principalement dû au fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale, on qualifiera de « non-mitochondriaux » les ROS issues du fonctionnement des oxydases : *Nicotinamide Adenine dinucleotide-dépendant oxidase* (Nox), Aldehydes oxydases (AO), Xanthine oxydases (XO), Glucose oxydases (GO), du découplage de la NO synthase endothéliale (eNOS) ou bien du fonctionnement des enzymes du cytochrome P450 du réticulum endoplasmique.

Trois principaux radicaux impliqués dans la signalisation sont ainsi produits à partir de l'O₂ : l'anion superoxyde (O₂^{•-}), le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) ainsi que le radical hydroxyle (•OH). Ces molécules permettent d'induire de nombreuses réponses physiologiques notamment vis-à-vis d'un pathogène ou en réponse à des signaux provenant de facteurs de croissance et/ou de différenciation ou encore de signaux apoptotiques.

Cependant, bien que ces molécules soient issues du fonctionnement normal de la cellule, elles deviennent hautement toxiques lorsqu'elles sont produites de manière incontrôlée. Par leur haute réactivité, les ROS seuls ou en combinaison avec des espèces réactives de l'azote (RNS – *Reactive Nitrogen Species*), interagissent avec les différents substrats biologiques pour former trois modifications :

- Les peroxydations lipidiques dont le 4-hydroxy-2-nonenal (4-HNE) est le principal produit issu de l'action des ROS sur les phospholipides poly-insaturés.
- L'oxydation des protéines dont la carbonylation est le principal marqueur de conditions pathologiques résultant majoritairement de l'action du radical •OH sur les chaînes d'acides aminés dont la proline, l'histidine, l'arginine, la cystéine et la lysine sont particulièrement sensibles.
- La formation d'adduits de l'ADN dont l'action est également due au radical •OH, tant sur les bases azotées que sur les désoxyriboses.

Afin de contrebalancer les dégâts oxydatifs causés par les ROS, la cellule dispose d'un système de défenses anti-oxydantes composé d'un réseau d'enzymes et de substrats non-enzymatiques tels que les vitamines E et C et le tampon glutathione. Parmi les enzymes antioxydantes, les plus étudiées sont :

- La superoxyde dismutase (SOD) existant sous 3 isoformes, catalyse la réaction de dismutation de l'anion O₂^{•-} en H₂O₂ et O₂. La CuZnSOD (SOD1) est spécifique du cytosol, la MnSOD (SOD2) est spécifique de la mitochondrie et la SOD3 est exprimée de manière extra-cellulaire.
- La Catalase est présente dans les peroxysomes et permet de finaliser la dégradation du H₂O₂ en H₂O (entamée par la SOD)
- La Gluthathione peroxydase (GPx) permet également de transformer l'H₂O₂ en H₂O, ainsi que de réduire les peroxydes organiques en alcool.
- Les peroxyredoxines (Prdxs) sont, quant à elles, des protéines utilisant les fonctions thioredoxines de résidus cystéines pour éliminer l'H₂O₂, les hydroperoxydes et les peroxydinitrites.

Au niveau musculaire, de manière analogue au déséquilibre entre la synthèse et la dégradation protéique dans l'atrophie, le stress oxydant/nitrosatif correspond à un déséquilibre entre les capacités oxydantes et anti-oxydantes. Il peut intervenir de manière physiologique à la suite d'un exercice²⁰⁰ ou de manière pathologique telle que dans la myopathie de Duchenne. (Figure 14)

Etant donnée l'élévation du stress oxydant pulmonaire et systémique, l'implication de celui-ci dans la dysfonction musculaire chez le patient BPCO a naturellement été étudié. En effet, de nombreuses études dans les années 2000 (revues par *Maltais et coll* en 2014⁶⁵) ont permis de mettre en évidence que, tant au niveau pulmonaire que systémique, les patients présentent une élévation du niveau de stress oxydant, notamment caractérisé par une surproduction de ROS mitochondriaux²⁰¹. Parmi ces études, *Fermoselle et coll* ont notamment mis en évidence que, chez des patients sévères, la tolérance à l'effort était d'autant plus faible que le niveau de stress oxydant était élevé ($\uparrow O_2^{\cdot-}$, \uparrow MyHC oxydées, \downarrow SOD1-2), et que ces patients présentaient également une élévation des marqueurs de dégradation protéique du système UPS⁷⁵. Ces patients souffraient également d'une atrophie des fibres musculaires de type II, ainsi que des niveaux plus faibles de créatine kinase (CK) suggérant l'importance du stress oxydant dans la régulation de la masse musculaire.

De manière surprenante, *Pomiès et coll* ont montré la persistance d'un stress oxydant dans les cultures primaires de patients BPCO qui était associé à un phénotype atrophique des myotubes issus de ces cultures, suggérant un impact profond du stress oxydant sur les muscles des patients^{202,203}. Il faut souligner que plusieurs équipes ont montré un excès de ROS dans les muscles de patients BPCO tant au repos, qu'à l'effort, susceptible d'altérer les performances musculaires^{204,205}. *Barreiro et coll* en 2009 et *Rodriguez et coll* en 2012, ont d'ailleurs montré que des patients sévères présentaient un niveau de carbonylation protéique musculaire plus élevé comparé à des sujets sains, et malgré des gains de tolérance l'effort, les niveaux de stress oxydant/nitrosatif n'étaient pas diminués par un REE en endurance de 3 et 8 semaines^{206,207}. A noter que seuls les sujets sains ont vu une amélioration des capacités anti-oxydantes, avec notamment une augmentation de l'activité de la SOD. L'accumulation d'inclusions de lipofuscine intramusculaire qui est également un marqueur de déficit en défense antioxydante, est augmentée chez des patients présentant une atrophie musculaire²⁰⁸. Enfin, tant au niveau des muscles respiratoires (diaphragme et intercostaux) que des muscles squelettiques (*vastus lateralis* et *rectus femoris*), le niveau de peroxydations lipidiques, de carbonylations protéiques et de stress nitrosatif est augmenté chez les patients BPCO²⁰⁹⁻²¹¹.

L'ensemble de ces résultats suggère que le stress oxydant/nitrosatif a un rôle important dans l'altération du métabolisme musculaire et la régulation de la masse, pouvant entraîner à terme un épuisement des capacités antioxydantes du muscle, qui pourrait par la suite induire une perte de fonction. Une explication possible de ce mécanisme serait que le stress oxydant/nitrosatif modifie de manière post-traductionnelle les protéines et enzymes impliquées dans le métabolisme contractile telles que la CK ou les MHCs, conduisant à un déficit d'activité et/ou à leur dégradation⁷⁵.

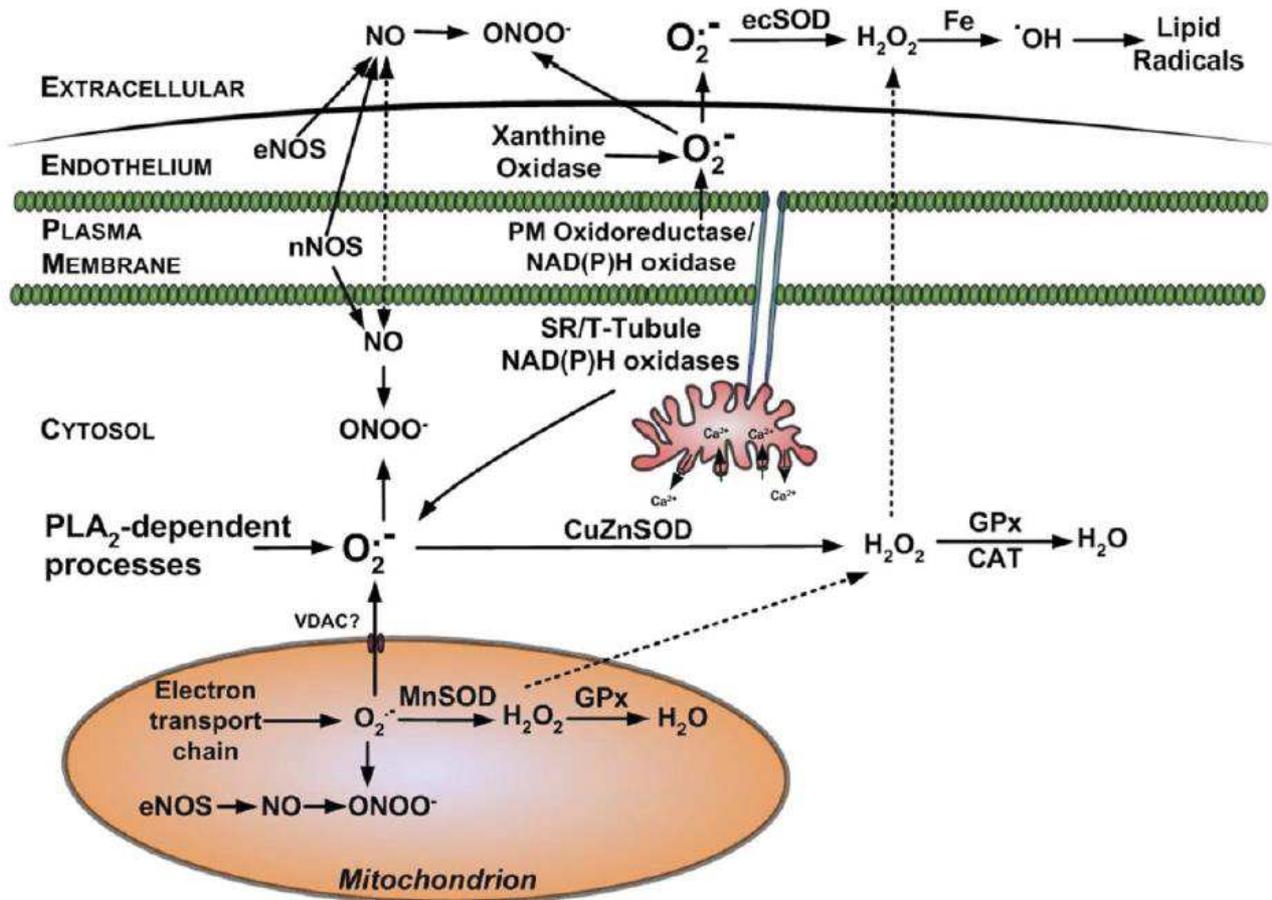


Figure 14 : Schéma synthétique des voies de régulation du stress oxydant musculaire et des sites potentiels de production d'anion superoxyde et oxyde nitrique dans le muscle squelettique²⁰⁰

2.5.6. Inflammation :

Parmi les processus biologiques les plus étudiés dans le cadre de la dysfonction musculaire, l'inflammation occupe une place prépondérante. L'inflammation constitue la réponse organisée du système immunitaire à un stress externe (infection, trauma, lésion, brûlure...) ou interne (provenant de cellules tumorales), dans le but d'enclencher un « programme » permettant d'éradiquer la source à l'origine de ce stress et de réparer les tissus endommagés. Face à la grande diversité des stress, le système immunitaire dispose alors d'un large éventail de modalités pour répondre à celui-ci, tant d'un point de vue des cellules impliquées (neutrophiles, éosinophiles, macrophages...) que des médiateurs sécrétés (cytokines, prostaglandines...). Cependant, afin que la régénération tissulaire puisse aboutir, la dynamique des processus inflammatoires doit être finement régulée. Plus particulièrement au niveau musculaire, on distingue 3 phases lors de la réponse inflammatoire²¹²⁻²¹⁴ : (Figure 15)

- Phase aiguë (1^{ère} vague) : caractérisée par la nécrose des fibres endommagées, fait intervenir les cellules du complément dont l'activation précoce par les débris cellulaires générés mène à l'infiltration de cellules mastocytaires et de neutrophiles afin de nettoyer la lésion.
- Phase sub-aiguë « inflammatoire » (2^{ème} phase) : caractérisée par l'activation de cellules souches musculaires et leur prolifération, notamment induite par la sécrétion de cytokines (TNF- α , IFN- γ , IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-12, IL-13...) produites par l'infiltration de macrophage M1 et de lymphocytes T.
- Phase tardive « anti-inflammatoire » (3^{ème} vague) : caractérisée par la différenciation des cellules souches musculaires néo-formées, afin de finaliser la régénération tissulaire. On note également un *switch* de fonction du système immunitaire, passant d'un environnement pro- à anti-inflammatoire *via* l'intervention de macrophage M2 et de Lymphocytes T_{reg} sécrétant des cytokines anti-inflammatoires (IL-4, IL-10, IL-13, IL-33).

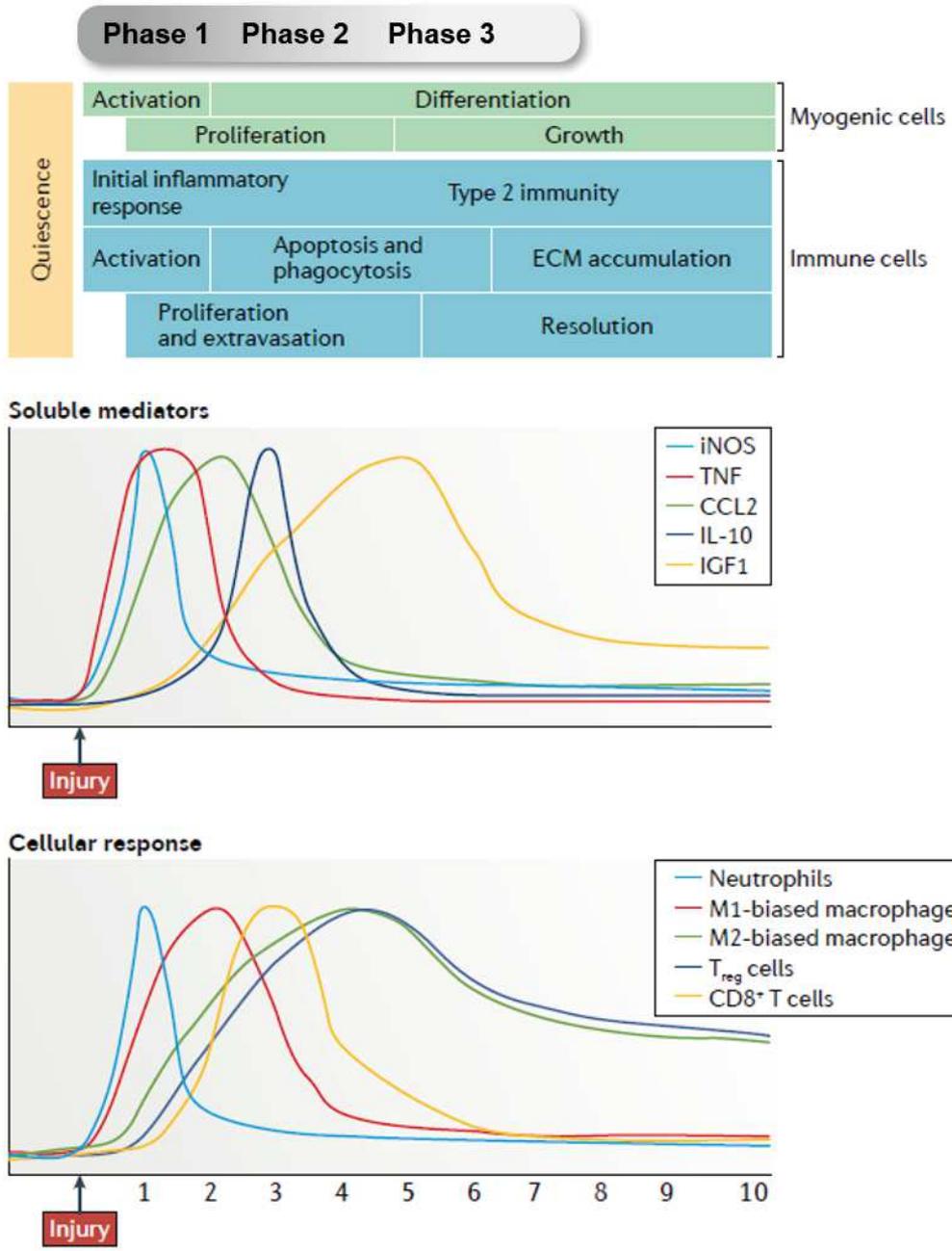


Figure 15 : Représentation du lien temporel entre régénération musculaire et inflammation, illustrant la transition depuis la phase inflammatoire initiale à la réponse immunitaire anti-inflammatoire, adaptée de Tidball et al²¹⁴

D'une part, l'inflammation incontrôlée peut modifier la signalisation dépendante du NO au sein du site lésionnel, ce qui peut conduire à un excès de fibrose²¹⁵. D'autre part, de nombreuses études *in vivo* et *in vitro* ont mis en évidence une activation des voies de la dégradation protéique conjointement à une inhibition de la synthèse protéique suite à l'exposition à des cytokines inflammatoires^{216–219}. Cette élévation du catabolisme peut ainsi conduire à la dégradation de facteurs clés impliqués dans les processus de prolifération et/ou de différenciation musculaire.

A noter que le stress oxydant, étant aspécifique, est également susceptible d'amplifier la quantité de protéines altérées/dégradées qui doit être prise en charge par les systèmes de dégradation. De plus, à l'image des études montrant l'implication du TNF α dans la déstabilisation de l'intégrité du réseau mitochondrial au niveau cardiaque, l'inflammation pourrait également être l'origine d'une surproduction de ROS au niveau musculaire^{220,221}. Ainsi, comme évoqué par *Taivassalo et Hussain*, la mitochondrie par son implication dans l'apoptose et la production de ROS, pourrait être l'intermédiaire dans la communication croisée entre l'inflammation et le stress oxydant à l'origine d'une dysfonction musculaire chez le patient BPCO²²².

Il semble, de manière générale, que l'inflammation tienne un rôle plus large dans la survie de la cellule et de l'organisme en réponse à un stress. En effet, l'ensemble des processus de dégradation et de recyclage des constituants biologiques semble être orienté pour maintenir l'intégrité de la cellule, afin d'éviter à celle-ci d'entrer dans une voie de tumorigenèse. En réponse à un signal oncogénique (via l'inflammation), les cellules sont capables d'entrer dans un état de sénescence prématurée afin de contenir la progression tumorale tout en maintenant l'intégrité tissulaire^{223,224}. Etant donné que la prévalence de rhabdomyosarcome (cancer du muscle strié) chez l'adulte est faible, il est fort probable que les mécanismes d'hypercatabolisme, en réponse à une inflammation, fassent partie du *continuum* des processus biologiques permettant le maintien du métabolisme cellulaire, tout en retardant la perte de fonction tissulaire^{225,226}.

Il est donc envisageable que dans le cadre de pathologies chroniques telles que la BPCO, qui sont généralement caractérisées par des phénomènes d'inflammation « de bas-grade », que la dysfonction musculaire puisse être le résultat d'une perturbation de la cinétique de régénération musculaire induite par l'inflammation. En effet, il est communément admis que les patients présentent une élévation du niveau circulant de cytokines pro-inflammatoires (TNF α , CRP, IL-6, IL-1 β) et de cellules de l'immunité (neutrophiles, éosinophile), et ce de manière plus importante encore dans les phases

d'exacerbation^{227,228}. En accord avec les modèles cellulaires et animaux d'atrophie induite par l'inflammation, ce niveau élevé d'inflammation circulante coïncide avec une élévation des E3-ligase MuRF1, Atrogin1 ainsi que Nedd4 dans les muscles squelettiques de patients^{114,116}. Bien que certains résultats de la littérature soient contradictoires, reflétant ainsi l'hétérogénéité de la maladie dans l'état d'activation des mécanismes de maintien de la masse musculaire, ces processus passent par une activation du facteur NFκB^{75,120,229-231}, un facteur central dans le *cross-talk* des voies de l'inflammation, des ROS et de la dégradation musculaire.

Bien que l'interaction entre les voies de l'inflammation et la régulation de la masse musculaire semble être impliquée dans la dysfonction musculaire des patients, il subsiste toujours des zones d'ombre notamment dans la compréhension de l'impact des processus inflammatoires dans la récupération de la masse musculaire suite à un REE chez le patient BPCO.

2.6. Interventions thérapeutiques : restaurer la fonction musculaire :

Il n'y a aujourd'hui plus aucun doute concernant les effets bénéfiques d'une approche thérapeutique globale telle que la RR dans la prise en charge des patients souffrant de maladies respiratoires chroniques²³², et peut être envisagée rapidement après un épisode d'exacerbations, et permet notamment de réduire le déclin fonctionnel dans les phases critiques de la maladie²³³.

Depuis plus de deux décennies cette approche mêlant REE, éducation thérapeutique et soutien nutritionnel et comportemental a montré un intérêt incomparable dans l'amélioration des symptômes respiratoires, musculaires mais également psychologiques²³⁴. En effet, la RR permet de diminuer la dyspnée et d'améliorer la tolérance à l'effort, participant de manière générale à une amélioration de la qualité de vie des patients. En outre, ce n'est pas uniquement sur le plan physique que la RR présente des bénéfices, mais également sur le plan psychologique en réduisant les phénomènes d'anxiété et de syndrome dépressif qui peuvent accentuer les symptômes²³⁵⁻²³⁸.

2.6.1. Le REE :

Le REE est dispensé dans le cadre d'une RR sur une durée allant de 4 à 12 semaines (variable selon les pays – 8 semaines préconisées par l'HAS²³⁹), et constitue la « pierre angulaire » des améliorations fonctionnelles musculaires. Pour cela, le clinicien dispose d'un large éventail de modalités visant à rétablir les capacités à l'exercice des patients.

Trois principes régissent les programmes de REE¹³³ :

- Être dédié aux besoins individuels de chaque patient
- Excéder la charge habituelle supportée par le patient, afin d'induire une habitude à surmonter l'effort
- Progresser à mesure que le patient améliore ses performances

On distingue alors plusieurs stratégies :

Type de programme	But	Modalités
Endurance	Améliorer les capacités aérobies	Vélo et marche
Fractionné	Améliorer la tolérance des patients dans l'incapacité d'assurer des entraînements en endurance réguliers	Exercices à haute intensité espacés d'exercices à faible intensité ou de repos
Résistance/Force	Améliorer la fonction de groupes musculaires spécifiques ciblés	Exercices composés de répétitions de levées de charges lourdes
Entraînement des muscles des membres supérieurs	Améliorer la tolérance des tâches du quotidien (habillement, toilette...)	Entraînement mixte composé d'exercices en endurance et en résistance
Entraînement des muscles inspiratoires	Améliorer la dyspnée et la tolérance à l'effort	Entraînement présentant une charge $\geq 30\%$ de pression inspiratoire maximale

Sur les plans anatomique et moléculaire, les exercices en résistance et en endurance favorisent le gain de masse, de force et améliorent les capacités oxydatives musculaires^{240,241}. Ses modifications peuvent être optimisées par des approches complémentaires de supplémentation nutritionnelle et/ou pharmacologique, supportées par de l'oxygénothérapie et pouvant également être associées à des approches de stimulation électrique ou magnétique.

2.6.2. Optimiser le REE :

2.6.2.1. Supplémentation nutritionnelle :

Comme évoqué plus haut, la malnutrition est un facteur de risque chez les patients BPCO, c'est pourquoi une réorganisation des apports nutritionnels par une régime adapté/supplémenté apparaît comme pertinent pour favoriser les effets bénéfiques initiés par le REE.

*Pison et coll*²⁴² ont montré qu'une intervention multimodale de 3 mois associant une supplémentation nutritionnelle à un apport de testostérone par voie orale et de l'exercice physique, permettait d'améliorer la composition corporelle (IMC et IMM) et les capacités fonctionnelles musculaires (puissance et endurance) chez des patients dénutris. Cette approche a également montré une amélioration de la qualité de vie de ces patients avec une progression de l'espérance de vie à 15 mois²⁴². Malgré l'absence d'effet additionnel avec l'exercice, une supplémentation combinée en leucine, vitamine D et oméga-3 a montré une amélioration du statut nutritif et de la force des muscles inspiratoires, favorisant ainsi le l'augmentation du niveau d'activité²⁴³. Récemment, une supplémentation en vitamine C et E, zinc et sélénium a permis d'améliorer le statut antioxydant, la force et la quantité de protéines circulantes de patients ayant suivi une RR de 24 sessions²⁴⁴.

2.6.2.2. Pharmacothérapie/Oxygénothérapie :

→ *Bronchodilatateurs :*

L'utilisation de bronchodilatateurs est une approche pharmacologique qui, malgré des effets modestes chez les patients BPCO, reste indispensable dans la gestion des limitations ventilatoires à l'effort ainsi que dans l'amélioration de leurs performances. En effet, une bronchodilatation optimale permet de limiter l'interruption des exercices à cause à d'une limite respiratoire traduisant ainsi la possibilité de réentraîner les patients à un niveau d'intensité plus important²³⁴. A titre d'exemple, l'utilisation d'un agoniste anticholinergique à longue durée d'action, le bromure de tiotropium (*Spiriva*), a permis

d'améliorer durablement (jusqu'à 3 mois post-RR) les capacités d'endurance de patients ayant suivi un REE²⁴⁵.

→ *Oxygénothérapie* :

Dans une approche de meilleure gestion des échanges gazeux, l'oxygénothérapie a également été envisagée dans l'optimisation du REE. Bien que l'expérience ait été réalisée en condition de laboratoire, une étude a rapporté les bénéfices de l'approche dans un programme d'exercice physique de 7 semaines chez des patients modérés/sévères ne présentant pas de désaturation à l'effort. Cette supplémentation a permis aux patients de maintenir un effort physique de plus haute intensité, améliorant ainsi leur capacité d'endurance, tout en abaissant la fréquence respiratoire à l'effort, équivalente au groupe non-traité²⁴⁶.

→ *Anabolisant musculaire* :

Une des limites de l'étude de *Pison et coll* concernant l'utilisation de testostérone, résidait dans l'impossibilité de discerner les effets anabolisants de l'hormone, des effets propres de la supplémentation nutritionnelle. Cependant, une étude visant à évaluer le potentiel thérapeutique d'une supplémentation en nandrolone au cours d'une RR de 8 semaines avait déjà permis d'analyser l'intérêt thérapeutique des propriétés anabolisantes des hormones stéroïdiennes. L'injection à trois reprises de 50 mg de la molécule au cours du programme avait permis d'améliorer l'IMM des patients supplémentés, en plus de l'amélioration du poids et de la puissance max à l'inspiration observée également dans le groupe placebo²⁴⁷.

→ *Molécules à action musculaire non-testées durant un REE* :

D'autres molécules ont également montré des bénéfices potentiels au niveau musculaire mais qui n'ont pas encore été utilisées dans le cadre d'un REE chez les patients BPCO. Parmi celles-ci, le NAC (N-acétylcystéine) et le Lévosimendan ont montré un intérêt potentiel dans la fatigue diaphragmatique des patients BPCO. Le NAC est un acide aminé non-essentielle dont les propriétés antioxydantes ont permis de rétablir la quantité de glutathion plasmatique chez des patients BPCO (sans effet sur la tolérance à l'effort)²⁴⁸ et de réduire leur fatigue diaphragmatique induite par des charges inspiratoires de haute intensité chez des sujets sains²⁴⁹. Dans une étude similaire, le Lévosimendan (*Zimino*) généralement utilisé dans le traitement de l'insuffisance cardiaque, a été utilisé comme agent inotrope « sensibilisateur au calcium » pour préserver la contractilité et l'efficacité neuro-mécanique du diaphragme chez des sujets sains²⁵⁰. Il a également permis

d'améliorer la force de contraction de fibres diaphragmatiques isolées issues de patients BPCO ou de sujets sains²⁵¹.

Au niveau des muscles squelettiques, l'injection répétée de ghréline, sécrétagogue stimulant notamment la prise alimentaire, a permis d'améliorer la composition corporelle (poids et IMM) de patients BPCO dénutris. Ces adaptations se sont accompagnées de bénéfices fonctionnels notamment d'une augmentation de la force au test de *hand-grip*, d'une meilleure endurance et d'une élévation des pressions maximales inspiratoires et expiratoires²⁵².

Une récente étude menée chez des patients BPCO modérés-sévères (VEMS < 43%_{préd}) a d'ailleurs testé le potentiel thérapeutique d'un anticorps dirigé contre un des récepteurs de la myostatine (Activin type-II Receptor - ActRII) dans une étude clinique de phase IIa²⁵³. Outre la tolérance et la sûreté relative à la double administration du traitement, l'étude visait à évaluer les gains en volume musculaire (évalués par IRM) et les bénéfices fonctionnels au TDM6 sur 24 semaines. De manière encourageante, bien qu'aucun bénéfice au TDM6 n'ait été observé, l'administration de l'anticorps a induit une augmentation significative du volume musculaire dès la 4^{ème} semaine comparée au groupe placebo (+5,9% vs 0%) et cette différence a été maintenue jusqu'à la fin de l'étude (+5,0% vs -1,3%). Si les auteurs soulignent la présence d'un trouble de la composition corporelle chez ces patients (IMC < 20 kg/m²), ils justifient l'absence de gain fonctionnel au TDM6 par le fait que certains des sujets ne présentaient pas de déficit de performance. Par conséquent les prochaines études devraient inclure une majorité de patients avec des performances réduites à l'exercice. De cette manière, elles pourraient notamment corroborer les résultats relatifs aux études menées chez des sujets âgés sarcopéniques chez qui ce même type de traitement a montré des effets bénéfiques sur la vitesse de marche et la distance au TDM6²⁵⁴.

Finalement, le Roflumilast est un anti-inflammatoire utilisé chez le patient BPCO, qui améliore le VEMS et réduit le nombre d'exacerbation²⁵⁵. Son action inhibitrice de la phosphodiesterase-4 induit une augmentation de la concentration d'AMP-cyclique intracellulaire ce qui a pour effet d'inhiber les cellules immunitaires au niveau pulmonaire, mais qui stimule la phosphokinase A au niveau musculaire. Ce mécanisme induit permet de réduire les processus de protéolyse, c'est pourquoi le Roflumilast a été utilisé *in vitro* afin d'évaluer ses effets sur les myotubes en culture de patients BPCO. Il a ainsi été montré des effets bénéfiques sur le catabolisme musculaire de myotubes de patients BPCO cachectiques *in vitro*, suggérant un intérêt thérapeutique dans l'optimisation d'un REE²⁵⁶.

Entre autres, il a permis d'améliorer la transcription des gènes codants pour des protéines contractiles (MHCI et MHCII) et la follistatine (protéine inhibitrice des TGF β telle que la myostatine), tout en diminuant la quantité de protéines ubiquitinyliées et la transcription des E3-ligases (MuRF1 et Atrogin1), en association avec une diminution de l'expression de la myostatine.

2.6.2.3. Electrostimulation neuromusculaire :

L'électrostimulation neuromusculaire (NMES – *Neuromuscular Electrical Stimulation*) est généralement dédiée aux patients ne pouvant assurer une RR conventionnelle en raison d'une tolérance à l'effort particulièrement réduite²³⁴. Cette approche non-invasive consiste à appliquer une stimulation électrique transcutanée afin de solliciter une contraction musculaire des membres inférieurs, en contournant la commande motrice centrale volontaire et ne sollicitant pas l'appareil cardiorespiratoire (donc non-dyspnéisante)¹⁴¹.

Bien que les modalités ne soient pas comparables à un programme de REE et que les effectifs de patients soient restreints, la NMES a permis en 6 semaines d'améliorer la dyspnée, la force et l'endurance musculaire, et la sensation « d'effort » pour effectuer une tâche²⁵⁷. Dans une autre étude, malgré des protocoles de stimulation différents, *Bourjeily et coll* avaient obtenu des résultats similaires, sans amélioration significative de la consommation d'O₂²⁵⁸. Ce type d'approche donnant aussi la possibilité d'améliorer la récupération des paramètres fonctionnels de patients en phase d'exacerbation²⁵⁹. Plus récemment, *Maddocks et coll* avaient observé une amélioration de la distance parcourue au TDM6, de la contraction maximale volontaire du quadriceps et du volume musculaire du *rectus femoris* évalué par la mesure de surface de section des fibres (CSA – *Cross Sectional Area*). En revanche, les auteurs soulignaient la temporalité des effets induits par la NMES, puisque l'ensemble des bénéfices étaient perdus 6 semaines après l'arrêt de l'intervention²⁶⁰.

Il est possible que l'inclusion de la NMES dans un protocole standard de RR puisse prolonger les effets bénéfiques et/ou s'ajouter aux effets bénéfiques du REE tel que le montre l'étude de *Vivodtzev et coll*. En effet, des effets cumulatifs de la NMES à un REE de 4 semaines ont été observés sur les gains relatifs à la force, à la dyspnée et à la qualité de vie²⁶¹. Malheureusement, il est possible que cette combinaison ne puisse être envisageable que pour les patients aptes à suivre un REE (moins sévères), ce qui pourrait masquer de potentiels effets additionnels de la NMES. L'ensemble de ces résultats corroborent cependant la récente mise à jour d'une méta-analyse, suggérant un réel intérêt de NMES

dans la gestion de la faiblesse musculaire chez les patients atteints de maladies chroniques à un stade avancé. Les auteurs soulignent cependant le besoin de données complémentaires sur l'amplitude des effets escomptés de la NMES, notamment en combinaison avec un protocole standard de réhabilitation²⁶².

Afin de s'affranchir des effets indésirables liés à la NMES (irritabilité de la peau relative à l'application d'électrodes, sensation désagréable de la stimulation électrique), la stimulation magnétique a été envisagée afin d'induire les mêmes effets que la NMES. Bien que peu utilisée, cette approche a montré des effets bénéfiques sur la CSA des fibres de type I, la force, l'endurance et la qualité de vie, sans effet en revanche sur le statut redox des patients BPCO^{263,264}.

2.7. Limitations des interventions :

Bien que le REE améliore indéniablement la qualité de vie des patients, les bénéfices sont très variables d'un individu à un autre, et peuvent être limités, voire inexistant, chez certains. Bien que la notion de « patients non-répondeurs » soit encore débattue¹⁵⁴, l'efficacité de la RR représente un enjeu majeur de santé. Identifier les patients dits « non-répondeurs » et déterminer les modalités spécifiques de réentraînement pour ces patients, permettrait d'améliorer de manière globale l'adhérence aux programmes de RR et d'améliorer la prise en charge à long terme²⁶⁵.

Ces lacunes du REE à induire des bénéfices ont notamment été soulevées par *Gouzi et coll* en 2013, où les gains de consommation maximale d'O₂ à l'effort (V'O₂) et d'endurance observés chez des patients étaient inférieurs à ceux relevés chez des sujets sains appariés. Les auteurs précisent que les déficits concernant les gains induits par l'exercice peuvent difficilement être imputables à une différence d'intensité de réentraînement entre les groupes. En effet, l'intensité des exercices a été calibrée de sorte que la fréquence cardiaque atteinte au cours du réentraînement soit équivalente à celle du premier seuil ventilatoire (pour les sujets sains) ou à l'apparition des symptômes de dyspnée (pour les patients), représentant respectivement 69 et 66% de la fréquence cardiaque maximale des sujets. Le défaut de vascularisation et l'absence de *shift* typologique induits par l'exercice sont probablement le support biologique des gains limités en V'O_{2SL} et en endurance. De plus, il est probable que ces anomalies soient également responsables des défauts d'adaptation cardiaque à l'effort observés par la même équipe^{266,267}.

Promouvoir le maintien des bénéfices dans le temps est également un point sur lequel les programmes de réhabilitation peuvent encore être optimisés. Les récentes recommandations semblent appuyer l'importance d'entretenir les changements

comportementaux initiés par la thérapie, et notamment en maintenant un niveau d'activité physique quotidienne après la RR. Une étude récente a d'ailleurs mis en avant le maintien durant les 2 premières années suivant le programme des bénéfices du REE sur l'indice de sévérité BODE et l'endurance. La persistance des effets bénéfiques a été permise grâce au maintien du niveau d'activité physique post-réhabilitation²⁶⁸. Bien que cette étude encourage les approches favorisant le suivi d'une activité physique adaptée notamment à domicile, ce système nécessite encore des optimisations.

D'une part, des optimisations sur la « faisabilité » financière et matérielle semblent nécessaires, afin de rendre compatible de tels suivis pour un nombre croissant de patients. D'autre part, le déclin des bénéfices à l'horizon de la 3^{ème} année post-RR indique la marge de progression sur l'efficacité de ce type de dispositif. Ceci suggère également que malgré les changements comportementaux initiés par la RR, un facteur « maladie » semble détériorer les bénéfices obtenus grâce à la réhabilitation et que celui-ci n'est contrebalancé ni par la thérapie, ni les optimisations proposées un peu plus haut.

2.7.1. Limites de la supplémentation nutritionnelle :

Généralement employée pour parer à des carences ou des déficits nutritionnels, la supplémentation n'apporte pas de bénéfices additionnels au REE, au niveau musculaire. Une étude visant à identifier les bénéfices liés à une supplémentation nutritionnelle enrichie en leucine, oméga-3 et vitamine D dans le cadre d'un REE à haute intensité, avait permis de montrer aucun effet additionnel sur les paramètres fonctionnels des muscles des membres inférieurs²⁴³. De même, la consommation d'une boisson supplémentée en carbohydrate et glucose après chaque session d'un REE n'avait pas permis d'apporter des bénéfices fonctionnels au cours des 8 semaines du programme ²⁶⁹. *Deacon et coll* avait également fait l'observation que la supplémentation en Créatine n'avait pas apporté de bénéfices supplémentaires à une réhabilitation de 7 semaines ²⁷⁰. Plus récemment, malgré un effet modeste (+11%) sur la force musculaire et sur la proportion de fibres oxydatives (critères de jugement secondaires), la supplémentation avec un cocktail d'antioxydant (Zinc, Sélénium, Vitamines C et E) n'avait pas permis d'amplifier les gains en endurance (critère de jugement principal) en combinaison d'un REE de 6 semaines par rapport aux effets de l'intervention seule ²⁴⁴. Cette étude présente cependant un effet bénéfique sur les carences/déficits en antioxydant des patients, suggérant un intérêt à identifier les besoins spécifiques de chaque patient pour une future supplémentation ciblée.

2.7.2. Limites de la supplémentation pharmacologique et de l'oxygénothérapie :

La supplémentation pharmacologique semble également avoir montré des lacunes dans l'optimisation du REE. Si l'utilisation de glucocorticoïdes par voie orale dans la gestion des exacerbations est une stratégie efficace, elle demande cependant de la vigilance chez les sujets stables. D'après les recommandations, une utilisation des corticoïdes durant une courte période à faible dose permettrait d'obtenir des bénéfices, en évitant les effets secondaires ostéo-musculaires induits par ce type de molécules^{271,272}.

De même, face à la forte prévalence d'athérosclérose chez les malades BPCO, il semble que l'utilisation de médicaments de la famille des statines reste financièrement et techniquement la solution la plus équilibrée, malgré les principaux effets secondaires musculaires^{63,273}.

L'utilisation d'anabolisants tels que la testostérone ou la nandrolone n'a pas permis, en plus des bénéfices sur la composition corporelle, d'apporter des améliorations fonctionnelles au REE^{242,243,274}. Bien que des effets sur les muscles inspiratoires soient observés dans les groupes supplémentés, permettent-ils de supplanter les effets secondaires liés à la thérapie ? A ce jour, aucune donnée convaincante n'a permis d'établir de dose permettant aux femmes d'utiliser des anabolisants sans risque de virilisation. Quel recul avons-nous sur les effets à long terme d'une telle supplémentation, et notamment vis-à-vis du rétrocontrôle négatif exercé par les stéroïdes sur l'axe hypothalamo-hypophysaire ? De même, quels effets à long terme peut-on entrevoir sur les phénomènes d'érythrocytose liés à l'utilisation chronique de stéroïdes ? Bien que les effets aigus sur la fixation de l'oxygène et par extension, sur la tolérance à l'effort soient bénéfiques, il est possible que l'augmentation de la viscosité du sang puisse être problématique à long terme.

De manière analogue aux effets induits par les anabolisants, l'injection d'hormone de croissance (GH) durant un REE de 3 semaines a permis à des patients présentant un IMC < 18 Kg/m² d'améliorer leur masse maigre d'environ 2 kg, et de préserver ces bénéfices 2 mois après l'arrêt du traitement. Cependant, ces bénéfices morphologiques n'ont pas été accompagnés de gains fonctionnels complémentaires au REE. Au contraire, les auteurs ont constaté une diminution de la distance parcourue en TDM6 dans le groupe supplémenté en GH, suggérant de potentiels effets secondaires. Les auteurs mettent d'ailleurs en garde vis-à-vis d'une supplémentation à plus forte dose qui pourrait induire des bénéfices fonctionnels, aux détriments d'effets secondaires connus. Parmi les effets indésirables, les auteurs soulèvent l'hypothèse que la supplémentation en GH à forte dose (ou dose prolongée) augmente le métabolisme basal, entraînant une élévation de la consommation

de l'O₂ et de l'élimination de CO₂, ce qui chez un patient BPCO pourrait avoir des conséquences défavorables sur la dyspnée et la tolérance à l'effort²⁷⁵.

Une alternative à cette approche consisterait en l'injection de ghréline, afin d'induire des effets anaboliques par des voies communes à la GH (GH-dépendant), mais qui favoriserait les comportements de prise alimentaire et le métabolisme énergétique par des voies indépendantes de la GH. Bien que *Nagaya et coll* aient relevé des bénéfices fonctionnels à l'état basal sur l'endurance, la force des membres supérieurs et des muscles respiratoires, aucune étude n'a étudié l'intérêt de la ghréline au cours d'un REE²⁵². Une seule étude, orientée sur les aspects vasculaires, s'est intéressée aux effets de l'injection de ghréline à faible ou forte dose au cours d'un REE de 3 semaines chez des malades respiratoires chroniques (dont 16 patients BPCO sur 18). Aucune dose n'avait permis d'améliorer la V'O₂ des patients (critère de jugement principal) suggérant des bénéfices additionnels musculaires marginaux²⁷⁶. L'ensemble de ces résultats souligne les lacunes des approches de supplémentation pharmacologique pour améliorer les bénéfices initiés par le REE, et confirme la nécessité d'une meilleure compréhension des voies anaboliques pour promouvoir des gains fonctionnels plus importants.

L'oxygénothérapie a également montré ses limites dans l'optimisation du REE. Chez les patients les plus sévères, cette approche permet d'améliorer l'hypoxémie à l'effort et l'inconfort lié à la dyspnée. Cependant, ces bénéfices au niveau respiratoire ne semblent pas suffisants pour permettre d'élever l'intensité de réentraînement, ce qui pourrait expliquer que l'oxygénothérapie n'induit pas d'effet additif au REE au niveau musculaire²⁷⁷. *Héraud et coll* avaient d'ailleurs identifié un sous-groupe de patients « non-répondeurs » aux effets bénéfiques de l'oxygénothérapie. Si ces patients (environ 1/3 de la population étudiée) ne diffèrent pas d'un point de vue anthropomorphique et respiratoire, ils présentent cependant un défaut d'ajustement de la saturation en O₂ par l'oxygénothérapie durant un effort, ce défaut de correction conditionnant les bénéfices de tolérance à l'effort et de dyspnée. Ces résultats préliminaires suggèrent une identification au préalable des patients répondeurs à l'oxygénothérapie dans le cadre du REE ce qui permettra d'améliorer notre compréhension de la non-réponse des autres patients²⁷⁸.

2.7.3. Limites de l'électrostimulation :

Du fait que la NMES soit principalement indiquée pour favoriser la récupération musculaire fonctionnelle des patients les plus sévères (pas uniquement dans la BPCO), peu d'étude se sont intéressées aux bénéfices apportés par la NMES dans le cadre d'une réhabilitation chez des patients à des stades de sévérité plus modérée. Cette limite

expérimentale, également commune à de nombreuses études de supplémentation, soulève le manque de connaissance des effets bénéfiques de la NMES chez des patients ne présentant pas ou peu « d'anomalies » fonctionnelles²⁷⁹. Pourtant, les recommandations internationales semblent promouvoir l'élargissement de la RR à l'ensemble des patients, même chez ceux ayant été récemment hospitalisés pour une exacerbation. De cette manière, les bienfaits de la RR permettraient d'induire les changements comportementaux propices à ralentir le déclin de la qualité de vie des patients les plus modérés, tout en améliorant celle des patients les plus sévères^{234,259}. Malgré la fugacité des effets bénéfiques de la NMES, il est d'ailleurs possible que l'intérêt de la NMES ne réside pas uniquement dans une amélioration propre des paramètres fonctionnels chez les patients dans l'incapacité de suivre un programme de RR, mais également dans le maintien et la persistance à long terme des effets bénéfiques induits par la RR^{260,261}. Ainsi l'inclusion systématique de NMES dans le REE, pourrait améliorer l'efficacité à long terme de la réhabilitation.

2.8. Le « Spill-over » : hypothèse pour expliquer les limites des effets bénéfiques du REE

Malgré les nombreux progrès et avancées qui ont été réalisés dans la prise en charge des patients, la persistance des bénéfices et l'efficacité de la thérapie doivent encore être optimisées. Cependant, comment expliquer que l'ensemble des approches et mesures disponibles pour restaurer la fonction musculaire, et plus globalement la qualité de vie des patients, échoue encore à maintenir les bénéfices de la RR dans le temps ? De plus, comment expliquer que ces bénéfices ne semblent pas toujours à la hauteur des gains obtenus chez des sujets sains. Il est probable que des « mécanismes intrinsèques » à la maladie ne soient pas encore identifiés et ne soient pas ciblés, ou que partiellement, par la thérapie.

2.8.1. Inflammation des poumons à la dysfonction musculaire :

L'une des théories encore susceptible d'unifier nos connaissances, depuis les mécanismes physiopathologiques de la maladie jusqu'aux limites des approches thérapeutiques, est celle du « *Spill-over* » (débordement). Bien qu'initialement étudiée par *Vernooy et coll* en 2002 suspectant une relation entre inflammation pulmonaire et systémique, la théorie du « *Spill-over* » a été formulée et clairement exposée pour la première fois par Barnes et Celli en 2009 dans la revue *European Respiratory Journal*^{58,280}. Cette hypothèse, bien qu'incomplète, a le mérite de proposer une vision suffisamment

globale de la maladie pour pouvoir interconnecter les différents mécanismes biologiques impliqués dans la physiopathologie de la BPCO. C'est d'ailleurs l'immensité de ces interconnexions qui pourrait traduire l'hétérogénéité des symptômes observés, permettant, à juste titre, de qualifier la BPCO de syndrome²⁸¹. Cette théorie place le poumon comme élément initial de la maladie, en interface avec l'air extérieur et l'ensemble de l'organisme par le milieu intérieur (Figure 16). L'hypothèse formulée en 2009 propose que l'inhalation de particules/gaz toxiques provoque des dégâts au niveau pulmonaire entraînant une réaction inflammatoire. Cette réaction inflammatoire va alors « déborder » *via* la circulation systémique, sur l'ensemble de l'organisme et être à l'origine de nombreuses dysfonctions et comorbidités observées dans la maladie, notamment la dysfonction musculaire.

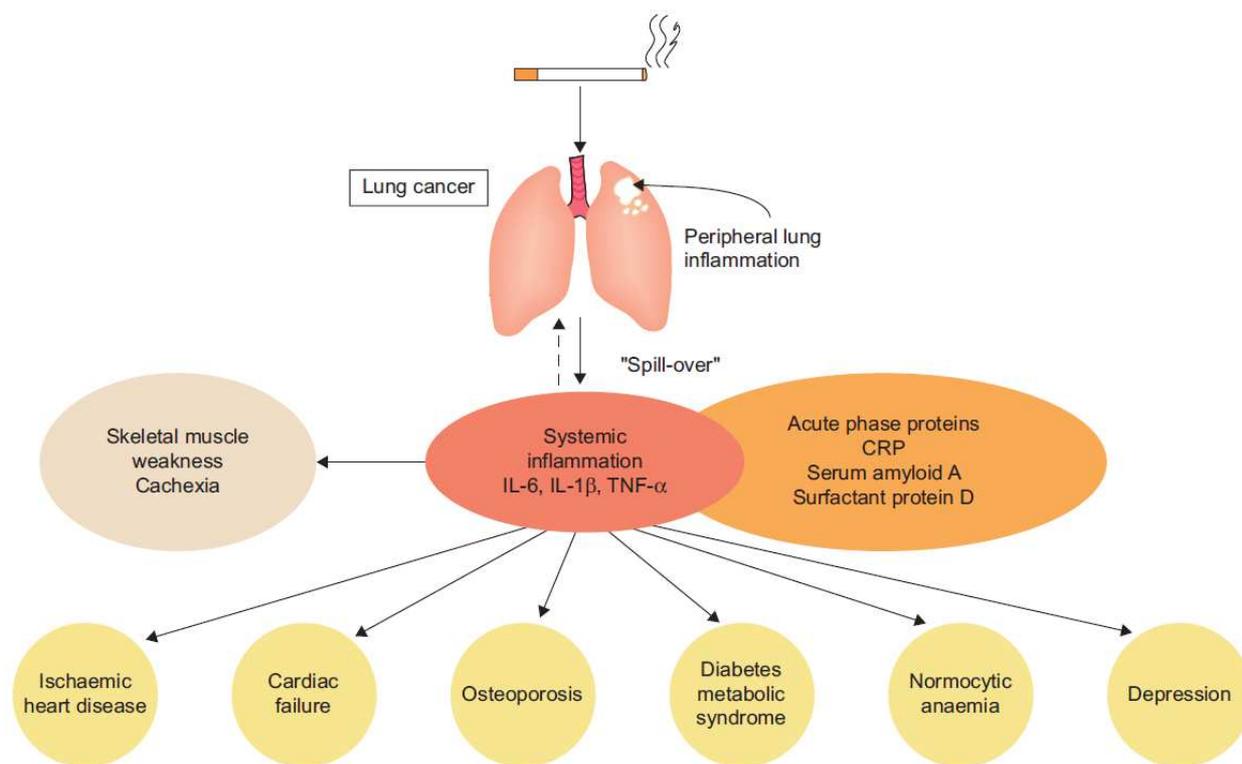


Figure 16 : Représentation de la théorie du « Spill-over » dans les effets systémiques et comorbidités dans la BPCO⁵⁸

2.8.2. Implication dans la dysfonction musculaire :

L'hypothèse du *spill-over* est supportée par plusieurs faits mettant en lien une inflammation pulmonaire caractéristique de la BPCO et des anomalies musculaires mises en évidence à la fois chez le patient mais également expérimentalement chez l'animal. Bien qu'il n'y ait pas encore de signature inflammatoire spécifique de la BPCO, il semblerait cependant que la réponse inflammatoire des patients BPCO soit différente de celle de sujets fumeurs ou non-fumeurs avec une fonction pulmonaire préservée²⁸².

Chez l'animal, le « modèle de BPCO » est principalement proposé chez les rongeurs comme la souris, le hamster ou le cochon d'Inde. Le modèle communément utilisé est celui de l'induction d'un emphysème par inhalation d'élastase (produite normalement par les neutrophiles)²⁸³ ou par une exposition chronique à de la fumée de cigarette²⁸⁴. Il est possible d'induire des mécanismes s'apparentant à des exacerbations en exposant chroniquement les animaux à du lipopolysaccharide bactérien (LPS). De manière similaire à ce qu'il se passe chez le patient, ce modèle permet de récapituler une grande partie des symptômes observés, puisque les animaux présentent une dysfonction pulmonaire, un emphysème avec infiltration de cellules inflammatoires (monocytes/macrophage) et d'une inflammation systémique, accompagnés d'une réduction de la masse musculaire et d'une altération intermittente de la force^{284,285}.

Au niveau moléculaire, cette atteinte musculaire se manifeste par une altération de la dynamique synthèse/dégradation protéique, en accord avec la précédente étude de la même équipe menée chez 92 patients BPCO (dont 42% de patients sarcopéniques). L'hypothèse avancée est qu'un état inflammatoire persistant favoriserait l'altération des processus de régénération musculaire, menant à terme à un épuisement du potentiel myogénique¹²².

2.8.3. Immunité et dysfonction musculaire :

L'hypothèse du *spill-over* dans l'atteinte musculaire est également supportée par de nombreuses évidences suggérant que les cellules de l'immunité et les médiateurs de l'inflammation ont un rôle important dans les processus de régénération musculaire, et pourraient être à l'origine de la dysfonction musculaire chez les patients. (Figure 17)

2.8.3.1. IL-6

L'IL-6 est l'une des cytokines inflammatoires les plus étudiées, notamment pour son implication dans de nombreux processus biologiques tels que la myogenèse²⁸⁶. Cette cytokine est d'autant plus importante que, dans la BPCO, son taux plasmatique est

augmenté et inversement associé à la présence de biomarqueurs de la régénération dans la circulation sanguine des patients²⁸⁷. Son rôle dans l'atteinte musculaire, *via* le « *Spillover* », est d'autant plus suspecté qu'elle est un indicateur indépendant de la dysfonction musculaire et pulmonaire²⁸⁸.

2.8.3.2. TNF α

Généralement associé à l'IL-6, le TNF α est une cytokine inflammatoire particulièrement étudiée dans la BPCO. En effet, son taux plasmatique ainsi que celui de son récepteur soluble sont augmentés chez les patients BPCO hypoxémiques présentant un IMC <18 kg/m² ²⁸⁹. Le TNF α est d'autant plus étudié dans la dysfonction musculaire que son administration chez des animaux est associée au catabolisme musculaire, ainsi qu'à l'anémie et à l'infiltration de leucocytes/neutrophiles dans les tissus, lorsqu'il est administré de manière chronique²⁹⁰⁻²⁹². Dans la BPCO, sa production est augmentée dans les monocytes issus de patients cachectiques²⁹³.

2.8.3.3. TNF-like weak inducer of apoptosis (TWEAK)

Dans la même famille que le TNF α , TWEAK est une cytokine controversée, qui pourrait bel et bien avoir un rôle dans la genèse d'une dysfonction musculaire chez le patient BPCO. En 2013, *Lazaar et coll* avaient observé chez 204 patients BPCO et 54 sujets sains provenant des cohortes ECLIPSE et du *Royal Brompton Hospital* de Londres que la concentration sérique de TWEAK soluble n'était ni reliée à la force de contraction maximale volontaire, ni à la distance de marche au TDM6, ni à l'IMM²⁹⁴. Cependant, une récente étude chinoise a montré que, malgré des concentrations 2 fois moins importantes que dans l'étude de *Lazaar et coll*, les concentrations sériques de TWEAK et de plusieurs autres cytokines étaient significativement augmentées dans le sérum de patients BPCO présentant une faiblesse musculaire, comparés à des sujets sains²⁹⁵. En parallèle une étude sur un modèle de BPCO induite chez le rat a également montré une augmentation de l'expression de TWEAK dans les muscles de ces rats, associée à l'ensemble des modifications structurelles observées chez l'homme (*shift* typologique, atrophie, inflammation, activation de la voie UPS)²⁹⁶. Ces résultats pourraient relancer l'intérêt pour TWEAK dans la dysfonction musculaire dans la BPCO.

2.8.3.4. IL-1 β

L'IL-1 β est également une cytokine qui est augmentée dans le sérum de patients BPCO et son implication dans la genèse d'une atrophie musculaire est fortement suspectée, étant donné que son expression est associée à celle du facteur NF κ B, acteur central du catabolisme protéique ^{291,297,298}.

2.8.3.5. IL-8

L'IL-8 (également CXCL8) est une chémokine qui est impliquée dans le recrutement de neutrophiles et de monocytes au niveau pulmonaire, et dont l'expression est augmentée chez les patients présentant un déficit de force lors d'une hospitalisation pour exacerbation²⁹⁹.

2.8.3.6. Protéine C Réactive (CRP)

Parmi les protéines de la phase aiguë de l'inflammation, la CRP fait partie des molécules qui semblent avoir un lien important avec le niveau d'activité physique et les capacités fonctionnelles musculaire et pulmonaire^{300,301}. D'une part, l'élévation de la CRP est associée à une augmentation du taux plasmatique d'IL-6 ainsi qu'à un impact plus important des symptômes sur la qualité de vie des patients, entraînant une diminution des capacités fonctionnelles musculaires (puissance et endurance) et d'une altération de la composition corporelle³⁰⁰. D'autre part, *Alahmari et coll* ont mis en évidence que les patients souffrant d'exacerbation fréquente (> 2/an) présentaient une diminution du niveau d'activité physique d'autant plus importante que le niveau de CRP plasmatique augmentait au cours d'une exacerbation³⁰².

2.8.3.7. Sérum Amyloïde A (SA-A)

De manière similaire à la CRP, la SA-A est une protéine produite en grande quantité au cours d'une exacerbation³⁰³. Majoritairement produite par le foie de manière IL-6-dépendante, la SA-A est susceptible d'être impliquée dans des mécanismes de fatigue musculaire induite par l'Angiotensine-II en altérant la synthèse protéique *via* une déstabilisation de la signalisation insuline/IGF1³⁰⁴. La SA-A semble être également impliquée dans l'expression d'Atrogin-1, par l'activation du récepteur *Toll-Like 2* (TLR2), suggérant une interconnexion potentielle entre l'inflammation systémique et la signalisation dépendante des Patterns Moléculaires Associés aux Dégâts (DAMPs)^{305,306}.

2.8.3.8. Monocytes et Macrophages

Bien que majoritairement étudiés pour leur fonction de phagocytose au niveau pulmonaire, les monocytes/macrophages pourraient avoir une incidence sur l'intégrité musculaire chez les patients BPCO. *Taylor et coll* relevaient, en 2010, un défaut d'activité de phagocytose des macrophages dérivés de monocytes de patients BPCO au niveau pulmonaire³⁰⁷. En parallèle, l'étude de *Menon et coll* montrait une tendance à une plus grande accumulation de macrophages au niveau musculaire chez les patients, ce qui suggère que cette accumulation est le reflet d'une inflammation musculaire persistante,

potentiellement due à un défaut de nettoyage des débris musculaires pouvant altérer les processus régénératifs³⁰⁸. A noter que les processus inflammatoires étant dérégulés, tant au niveau pulmonaire que systémique, la conversion des monocytes en macrophages pourrait être à l'origine de cette dysfonction⁵⁸.

2.8.3.9. Neutrophiles

Dans la même étude, *Menon et coll*³⁰⁸ relevaient également une élévation significative des infiltrations de neutrophiles musculaires. Tenant compte du fait que les neutrophiles, comme les macrophages, ont une fonction de phagocytose, leur accumulation suggère la présence de dégâts au niveau musculaire. Cependant, les neutrophiles sont également connus pour leurs capacités à dégrader le muscle en sécrétant des enzymes protéolytiques (ex : élastase) et pour produire des ROS^{308,309}.

2.8.3.10. Lymphocytes et Natural Killer (NK)

Peu d'études se sont intéressées aux rôles des lymphocytes et cellules NK au niveau musculaire dans la BPCO. Cependant, au regard de leurs fonctions inflammatoires cytotoxiques au niveau pulmonaire et des connaissances que l'on a de l'immunité adaptative dans d'autres pathologies, il semble logique d'envisager que ces cellules puissent avoir un rôle dans la mise en place de la dysfonction musculaire chez le patient³¹⁰. Dans une récente revue de littérature, *Deyhle et Hyldahl* récapitulaient le rôle crucial des cellules de l'immunité dans les processus régénératifs musculaires, en soulignant l'importance de la synchronisation des événements inflammatoires dans les interactions entre cellules de l'immunité et tissu musculaire³¹¹. A titre d'exemple, la chémokine CCL2 (aussi appelée MCP-1) est particulièrement impliquée dans le recrutement de macrophages/monocytes (poumon et muscle) et semble augmentée dans le sang de patient BPCO mais également chez des sujets obèses sarcopéniques^{312,313}. Son expression est modulée par les macrophages résidents et les lymphocytes, ce qui suggère qu'une augmentation des macrophages/monocytes musculaires chez les patients pourrait être le reflet d'une dérégulation de la régénération musculaire, médiée par une altération des processus inflammatoires *in situ* et systémiques.

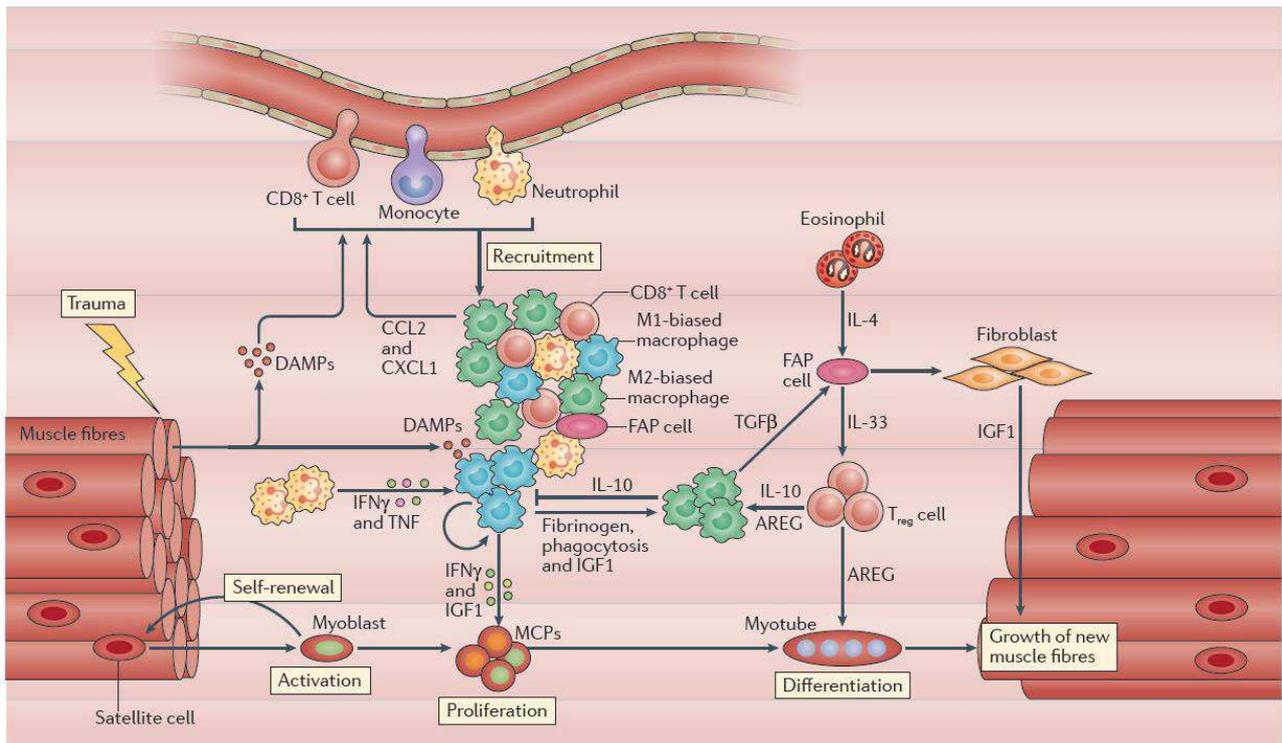


Figure 17 : Représentation de la complexité des interactions entre cellules myéloïdes, cellules lymphoïdes, progéniteurs fibro-adipogéniques et précurseurs myogéniques dans la régénération musculaire²¹⁴

2.8.4. Limites et ajustements de la théorie :

Bien que la théorie du *spill-over* ait pu être décrite comme « *an over-simplification* » de la complexité des altérations systémiques³¹⁴, elle peut être ajustée et continuer d'être valide.

D'une part, il apparaît très réducteur de ramener l'ensemble de l'étiologie de la maladie au « simple » tabagisme, et il semble aujourd'hui évident que l'exposition chronique aux différents facteurs de risque de la maladie entraîne des dégâts pulmonaires à l'origine de cette réponse inflammatoire. D'autre part, placer l'inflammation comme un effecteur unique, plutôt que comme un médiateur agissant au sein d'un réseau, semble dans ce cas « trop simpliste ».

D'un point de vue biologique, l'inflammation ne peut pas être considérée comme délétère, au même titre que le stress oxydant, le calcium, l'oxygène ou d'autres médiateurs impliqués dans la communication cellulaire. L'inflammation est un signal biologique permettant à l'organisme de mettre en place une réponse organisée et finement régulée, dans l'optique de réparer les tissus endommagés et de permettre à l'organisme de se débarrasser de l'élément perturbateur à l'origine de l'inflammation. Dans le cadre de la BPCO, l'organisme étant chroniquement exposé à un élément perturbateur extérieur, il est possible qu'en retour celui-ci induise une réponse inflammatoire persistante, qui ne s'interrompra qu'à l'arrêt de l'exposition à cet agent.

Cette vision peut cependant être remise en question de deux manières : la première par la persistance de la réponse inflammatoire même après l'arrêt de l'exposition à l'agent perturbateur (ex : cessation de tabagisme), la seconde par l'absence de réponse inflammatoire observée chez un sous-groupe de patients^{280,314}.

D'une part, à l'image des processus inflammatoires opérant dans le remodelage ventriculaire gauche après un infarctus du myocarde, la persistance de la réponse inflammatoire pulmonaire peut être le reflet de dégâts irréversibles et/ou d'une fibrose entraînant un remodelage du tissu pulmonaire³¹⁵. Ainsi dans cette hypothèse, la persistance de l'inflammation pulmonaire peut être le signe que les processus régénératifs échouent continuellement à rétablir l'intégrité du tissu pulmonaire et ce, même en l'absence de l'agent perturbateur extérieur. De manière analogue à ce qu'il se passe dans le cœur (anomalies du rythme cardiaque accompagnant le remodelage et la dilatation du ventricule gauche dans la phase tardive post-infarctus), l'emphysème et l'hyperinflation accompagnent le remodelage pulmonaire, entraînant le déclin de la fonction pulmonaire chez le patient BPCO.

D'autre part, concernant l'absence de réponse inflammatoire chez certains patients, il est possible que des mécanismes physiopathologiques similaires à ceux observés chez les personnes souffrant de stress chronique soient mis en jeu. Du fait d'être constamment exposées, les personnes souffrant de stress chronique présentent un dysfonctionnement de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien, qui se manifeste par une hypercortisolémie chronique. Celle-ci entraîne l'apparition progressive d'une résistance aux glucocorticoïdes, rendant l'organisme insensible au cortisol, et entraînant une incapacité de celui-ci à répondre à un stress ultérieur. On parle alors de phase « d'épuisement »³¹⁶. Cette phase tardive de résistance aux glucocorticoïdes est caractérisée par une baisse de l'efficacité des médicaments anti-inflammatoires, qui a notamment été décrite dans l'asthme³¹⁷. Il faut préciser que ce type de mécanisme est protecteur pour l'organisme, puisqu'il permet de maintenir un niveau d'intégrité tissulaire suffisant pour assurer la fonction. En effet, la signalisation dépendante des glucocorticoïdes est très demandeuse en énergie et nécessite une adaptation de l'ensemble de l'organisme (effet anti-inflammatoire, hypertension, utilisation des substrats énergétiques...), qui ne peut être maintenue sur de longue période. Si l'on transpose ce mécanisme « d'épuisement » à la BPCO, il est possible que la présence chronique de cellules et de médiateurs de l'inflammation entraîne un « épuisement » tardif de la réponse inflammatoire, et que ce processus serait l'ultime mécanisme de protection des tissus de l'activité catabolique des cellules de l'immunité.

Il faut souligner que certaines études ont pu montrer une absence de relation entre inflammation pulmonaire, inflammation systémique et déclin des capacités fonctionnelles pulmonaires, remettant en cause (en partie) la théorie du « *spill-over* »³¹⁸. Cependant, il semble important de signaler que plusieurs éléments avancés par *Sinden et Stockley* permettent d'ajuster la théorie initiale du « *spill-over* »³¹⁹. Tout d'abord, plusieurs études ont mis en évidence le transfert de molécules depuis les poumons dans la circulation systémique, que ce soit des molécules inhalées ou produites par les poumons. Ces molécules sont susceptibles d'avoir un mode d'action « en cascade », en engendrant une réponse tissulaire à distance de l'inflammation pulmonaire, notamment *via* les cellules de l'immunité³²⁰. De plus, nous avons évoqué plus haut la communication croisée qui existe entre inflammation et stress oxydant, et il semble envisageable que l'inflammation pulmonaire soit à l'origine d'une production de ROS dans la circulation, entraînant une réponse inflammatoire systémique. (Figure 18).

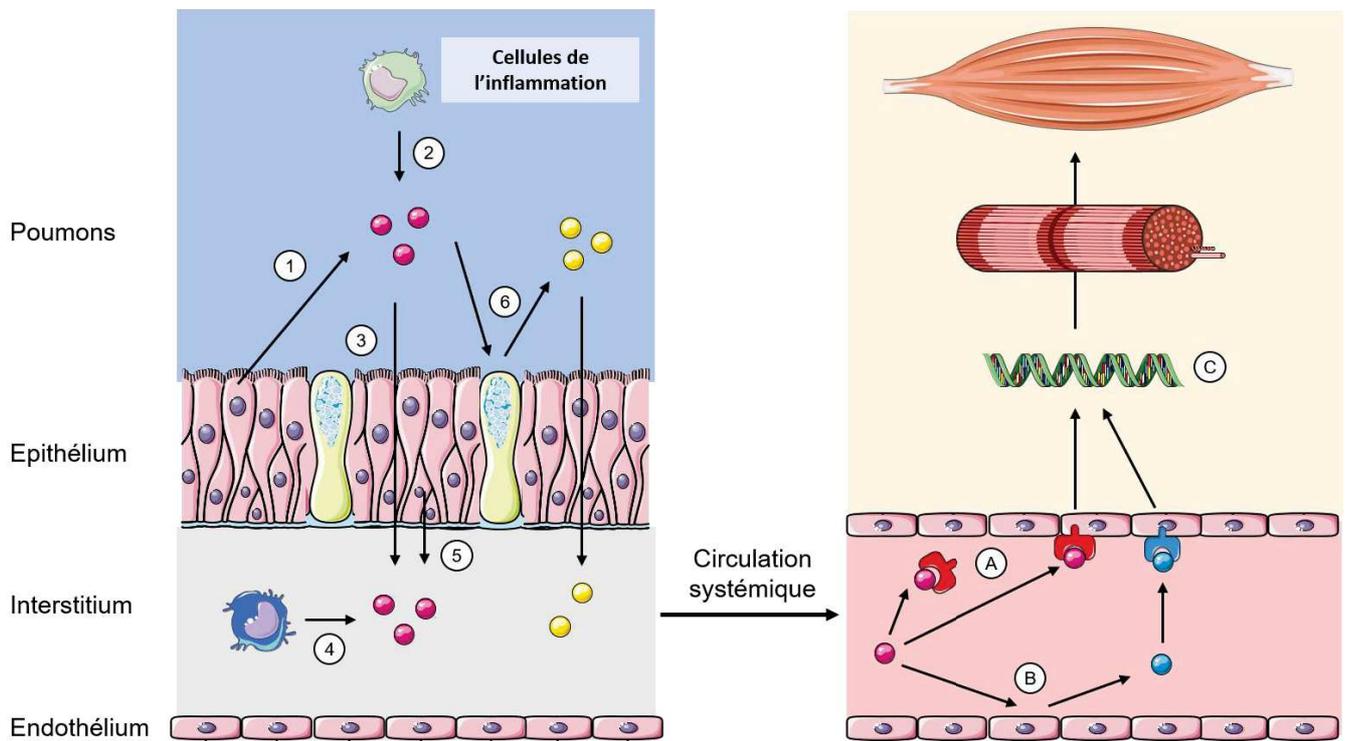


Figure 18 : Représentation des mécanismes influençant le mécanisme de « Spill-over » et sa détection. Adaptées de Sinden et Stockley (2010)³¹⁹

Plusieurs processus participent à la sécrétion de cytokines pulmonaires dans la circulation systémique (gauche) : (1) l'épithélium bronchique ou (2) des cellules inflammatoires peuvent relarguer des cytokines dans les sécrétions pulmonaires ou (5) dans l'interstitium. (3) Ces cytokines peuvent également diffuser depuis les sécrétions pulmonaires vers les tissus interstitiels, et (4) s'ajouter aux cytokines produites par des macrophages et autres cellules de l'immunité présentes dans l'interstitium. (6) La présence locale d'une cytokine peut entraîner la sécrétion d'une seconde cytokine dans les sécrétions bronchiques ou dans la circulation systémique.

Une fois dans la circulation (droite), (A) la liaison à un récepteur pourra influencer la mesure de la quantité de cytokine libre. (B) La présence d'une cytokine peut également induire la production d'une seconde cytokine qui sera le signal. (C) Le polymorphisme peut également affecter les effets induits par une cytokine.

Enfin, il faut ajouter que le nombre de cytokines et molécules pro-inflammatoires ayant été testées est assez restreint et que des études complémentaires sur un panel plus large de molécules est nécessaire pour statuer sur l'implication du « *Spill-over* » dans l'apparition de comorbidités chez le patient BPCO.

2.8.5. Autres molécules impliquées :

D'autres molécules impliquées dans la réaction inflammatoire semblent avoir soulevé un intérêt dans la physiopathologie de la BPCO. *Zemans et coll* ont notamment montré en 2017, que la combinaison de 5 biomarqueurs – le *Club Cell* 16 (CC16), le fibrinogène, la CRP, la Protéine D du surfactant (SP-D) et le récepteur soluble aux glycations terminales avancées (sRAGE) – était un meilleur marqueur prédictif de sévérité de la maladie, que chaque biomarqueur pris individuellement³²¹. Ce type d'approche pourrait permettre de mieux appréhender les différents sous-groupes (*clusters*) de patients, et notamment identifier les patients plus ou moins susceptibles de répondre positivement à une approche thérapeutique.

Cependant, bien que la théorie initiale mette l'inflammation pulmonaire au centre des débats il est cependant possible, avec le recul scientifique dont nous disposons en 2019, que cette réponse inflammatoire soit également accompagnée par la production d'autres médiateurs dans la circulation, afin d'interagir avec l'ensemble de l'organisme. Depuis une décennie, la recherche biomédicale a identifié des molécules susceptibles d'être dérégulées dans de nombreux processus physiopathologiques. La recherche sur le rôle des microARN (miR) a notamment permis un bond substantiel dans la connaissance de la régulation de l'expression génique. Ceci nous a permis de mieux comprendre des mécanismes physiopathologiques, notamment dans le fonctionnement du système immunitaire^{322,323} et avoir une rôle crucial dans la dysfonction musculaire dans la BPCO^{324–326}.

En 2014, *Georgantas et coll* ont notamment apporté de nouvelles informations sur le lien entre inflammation et régénération musculaire, en mettant en évidence que le TNF α inhibe la différenciation myoblaste-myotube C2C12, en réprimant la transcription de miR-1, miR-133 et miR-206³²⁷. En accord avec ce premier élément, *Lewis et coll* observaient une diminution du miR-1 associée à une baisse d'activité du facteur de réponse sérique (SRF) dans le muscle de patients BPCO. De plus, l'expression des miR-133 et miR-206 était inversement corrélée au niveau d'activité journalier¹²¹. En revanche, plusieurs équipes ont observé une élévation des miR-1 et miR-206 dans les biopsies de patients BPCO souffrant ou non de faiblesse musculaire^{328–330}. Enfin, plus récemment, une étude a mis en évidence que les miR-542-3p/5p étaient impliqués dans les défauts de synthèse de protéines

mitochondriales (le stress ribosomal mitochondrial) chez des patients BPCO et notamment ceux souffrant de faiblesse musculaire au cours d'un séjour en soin intensif. Parallèlement, cette étude a également montré que ces miR-542-3p/5p stimulaient la voie du TGF β en promulguant la phosphorylation de Smad2/3. La découverte de ces deux fonctions suggère donc un rôle potentiel des miR-542-3p/5p dans l'atrophie musculaire, qui a ensuite été confirmé en surexprimant ces deux miR chez la souris, provoquant une atrophie plus rapide et plus importante que pour une surexpression de la myostatine^{331,332}. L'ensemble de ces études rappelle une nouvelle fois le spectre infini d'interactions possibles entre les cellules et molécules impliquées dans les différents processus physiologiques, et ce qui justifie l'extrême hétérogénéité des symptômes observables.

Résumé

La dysfonction musculaire dont souffrent les patients atteints de BPCO se manifeste par une réduction de la masse musculaire qui s'accompagne d'une perte de force et d'endurance.

La perte de masse musculaire est due à un déséquilibre entre dégradation et synthèse protéique pouvant provenir d'une malnutrition, de l'hypoxie chronique, des traitements (glucocorticoïdes), d'une réduction de l'activité physique, de phénomènes inflammatoires, du stress oxydant ou d'une combinaison de l'ensemble de ces processus.

La réhabilitation respiratoire est une approche thérapeutique multidisciplinaire visant à rétablir une qualité de vie aux patients. La composante majeure est le réentraînement à l'effort qui consiste à rétablir une tolérance à l'effort *via* un programme d'activité physique adaptée.

Malheureusement, malgré des optimisations par différentes approches de supplémentation nutritionnelle, pharmacologique ou de stimulation électrique, les effets bénéfiques du réentraînement à l'effort restent partiels, temporaires voire inexistantes (chez près d'un tiers des patients).

Il est possible que l'inflammation pulmonaire persistante « déborde » *via* la circulation systémique sur l'ensemble de l'organisme et limite les bénéfices de la thérapie au niveau musculaire. Ce processus est appelé « Spill-over ».

3. Etudier le rôle du *spill-over* dans la régénération musculaire ?

Face à l'extrême complexité des processus intriqués, il n'est pas exclu que le *spill-over* puisse avoir un rôle dans la genèse de la dysfonction musculaire. Il apparaît même envisageable d'étendre l'hypothèse du *spill-over* à l'ensemble des défauts d'adaptation physiologique normalement induits par l'activité physique dans le cadre du REE, expliquant ainsi les limites de la thérapie dans la récupération de la fonction musculaire. Un argument soutenant cette hypothèse repose notamment sur l'échec de la RR à rétablir l'inflammation systémique, notamment sur le long terme³³³. Il apparaît donc pertinent d'étudier le rôle du *spill-over* dans les processus d'adaptation musculaire induits par le REE, mais il semble cependant complexe à étudier *in vivo*.

3.1. Culture primaire de myoblastes humains : modèle d'étude de la régénération musculaire :

Le rôle du « *Spill-over* » dans les adaptations musculaires liées au REE semble, tant d'un point de vue technique que légal, complexe à étudier chez l'homme. D'une part, mettre en évidence *in vivo* un lien de causalité entre l'inflammation pulmonaire et l'atteinte musculaire semble à l'heure actuelle impossible. D'autre part, la mise en place d'une étude nécessitant l'inclusion de sujets pour un programme de REE requiert non seulement des moyens humains et financiers considérables mais également l'approbation d'un comité d'éthique. Face à ces contraintes techniques et légales, l'utilisation de modèles expérimentaux alternatifs permettent néanmoins d'apporter les preuves de l'existence d'un tel mécanisme.

Parmi les approches possibles, la culture primaire de cellules musculaires humaines permet de cultiver des cellules musculaires à partir des cellules souches issues d'un tissu natif (ex : biopsie). Dans l'étude du « *Spill-over* », le modèle *in vitro* de culture primaire de cellules apparaît comme pertinent. En effet, s'intéresser au rôle du « *Spill-over* » dans la genèse et le développement d'une dysfonction musculaire correspond, à plus petite échelle, à étudier les effets du micro-environnement dans les processus régénératifs impliquant la cellule satellite. Dans ce cadre, le modèle *in vitro* de culture primaire de cellules musculaires semble être un outil puissant pour modéliser ces interactions.

3.1.1. Les étapes de la régénération musculaire :

Découverte par Alexander Mauro en 1961, la cellule satellite est la cellule souche sur laquelle repose les processus de régénération du tissu musculaire³³⁴. Situées en périphérie de la fibre musculaire, ces cellules sont maintenues quiescentes au sein d'une structure complexe qu'on appelle niche. Elle constitue un « sanctuaire » fonctionnel et structurel à haut niveau de régulation, suffisamment stable pour maintenir un programme génique de quiescence des cellules satellites (signaux intrinsèques), tout en assurant une certaine plasticité du tissu musculaire en réponse à des signaux (extrinsèques). Ceci permet une certaine stabilité de la fonction régénératrice de la cellule satellite, tout en favorisant la mise en place des processus hyper-dynamiques nécessaires à la régénération en réponse aux bouleversements induits par les signaux lésionnels (Figure 19)²¹².

En effet, la lésion génère une myriade de signaux (ex : DAMPs) suffisamment forts pour entraîner la rupture de la stabilité de la niche, poussant les cellules satellites résidentes dans un mode de prolifération asymétrique. Ce type de prolifération permet à la fois de maintenir les capacités régénératives du tissu en constituant une réserve de cellules satellites pluripotentes, tout en générant une grande quantité de cellules (myoblastes) qui seront le matériel cellulaire indispensable au remplacement des fibres endommagées. Le maintien des capacités régénératives est donc assuré par un groupe de cellules satellites qui préserve un niveau de pluripotence grâce à l'expression de facteurs tels que Six1/4, Pax3 et Pax7, permettant de maintenir la cellule satellite quiescente avec un pré-lignage musculaire. Le remplacement des fibres lésées est alors assuré par la prolifération de cellules satellites qui vont, en revanche, acquérir un phénotype musculaire et devenir des myoblastes puis des myotubes polynucléés *via* l'expression de facteurs myogéniques régulateurs (MRF). (Figure 20)

Ce processus de différenciation est appelé myogenèse et est assuré par l'expression coordonnée de 4 MRFs : MyoD, Myf5, Myogénine et Mrf4³³⁵⁻³³⁷. L'expression de ces facteurs supervise la cascade de protéines régulatrices sur laquelle repose les modifications structurelles et biologiques conduisant au passage d'une cellule mononucléée peu fonctionnelle (myoblaste), à une cellule polynucléée intégrée à la fibre musculaire et qui sera le support de la contraction musculaire³³⁸.

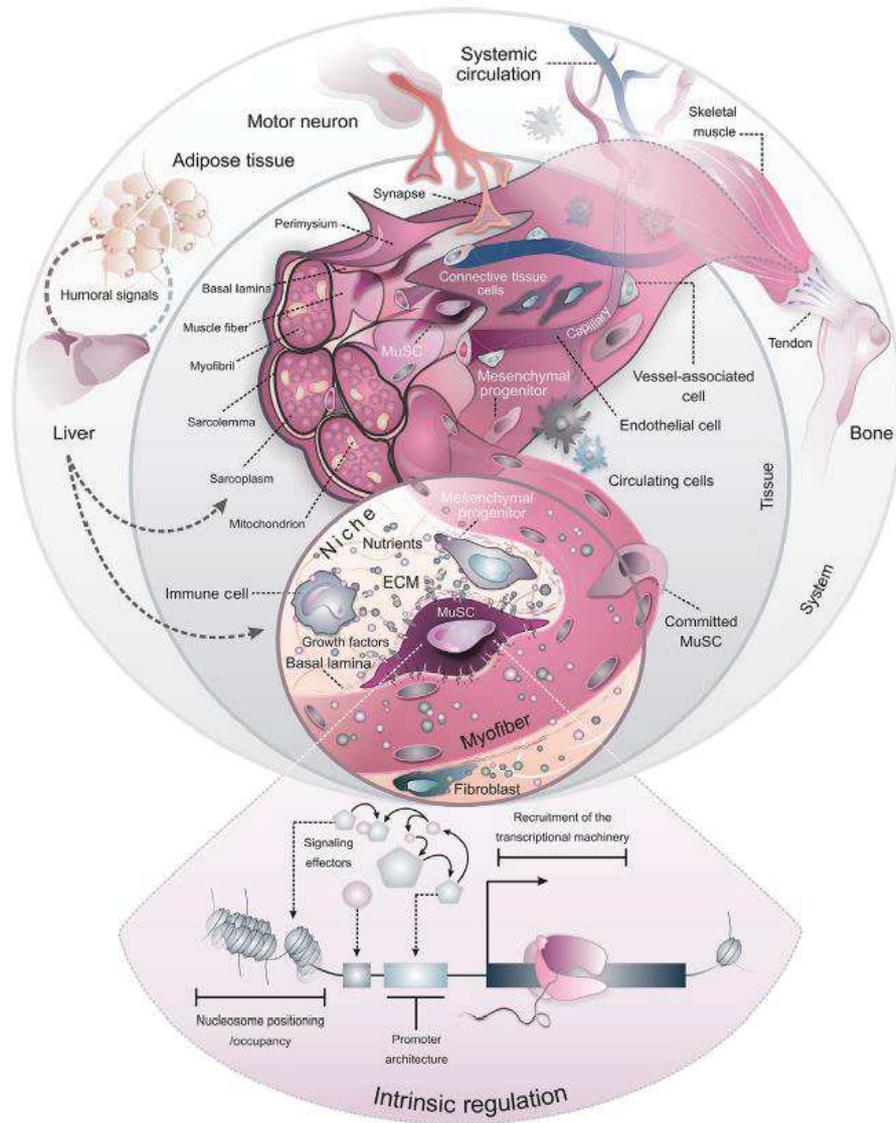


Figure 19 : Représentation des mécanismes de régulation extrinsèque (structure, signaux moléculaires, interactions cellules-cellules) et intrinsèques (épigénétique, activité des télomérases, signalisation constitutive) des fonctions de la cellule satellite par la niche cellulaire²¹²

3.1.2. Modéliser les conditions physiopathologiques *in vitro* de la régénération musculaire

La culture primaire de cellules musculaires humaines est un outil puissant permettant de reproduire, en tenant compte des limites qu'impose l'expérimentation *in vitro*, les conditions physiopathologiques dans lesquelles les étapes clés de la régénération musculaire s'effectuent. Par cette approche, il est possible d'avoir accès à des mécanismes jusqu'alors inaccessibles directement chez l'humain, tout en s'affranchissant de la « barrière de l'espèce » liée à l'expérimentation animale. Plusieurs mécanismes menant à la dysfonction musculaire dans la BPCO peuvent ainsi être étudiés, tel que l'hypoxie ou encore l'exposition à des cytokines.

Avant de donner un éventail succinct des possibilités qu'offre la culture primaire de cellules musculaires, la suite du manuscrit s'attardera sur les avantages de l'approche qui vont au-delà de l'aspect scientifique.

3.1.2.1. Avantages

La culture primaire de myotubes humains offre plusieurs avantages dans l'étude des mécanismes moléculaires relatifs à la fonction musculaire. Tout d'abord, cette approche permet de constituer une banque de tissus, dont les ressources sont « virtuellement inépuisables ». En effet à partir d'une biopsie musculaire, il est possible de purifier et d'amplifier un nombre quasiment infini de myoblastes que l'on peut conserver par cryoprotection dans de l'azote liquide (voir fiche technique 4 à 6).

L'un des points cruciaux de la robustesse d'un tel modèle est sa capacité à reproduire de manière suffisamment fidèle les conditions expérimentales *in vivo*. Bien que les progrès de l'ingénierie tissulaire permettent aujourd'hui de cultiver des cellules dans une architecture tridimensionnelle (3D) extrêmement fine, la majorité des approches sont encore menées dans une boîte de pétri (2D)³³⁸. Ce choix réside notamment dans la simplicité de la mise en place d'une culture 2D et la capacité de celle-ci à préserver des traits patho-phénotypiques spécifiques tels que l'insulino-résistance dans les cellules issues de patients diabétiques³³⁹ ou la désorganisation des myotubes associée à une sensibilité accrue au stress oxydant dans les cellules issues de patients souffrant de dystrophie facio-scapulo-humérale³⁴⁰. Dans le cadre de la BPCO, plusieurs groupes ont choisi cette approche pour la capacité des cellules à conserver un phénotype atrophique et des capacités anti-oxydantes altérées^{202,203,256}.

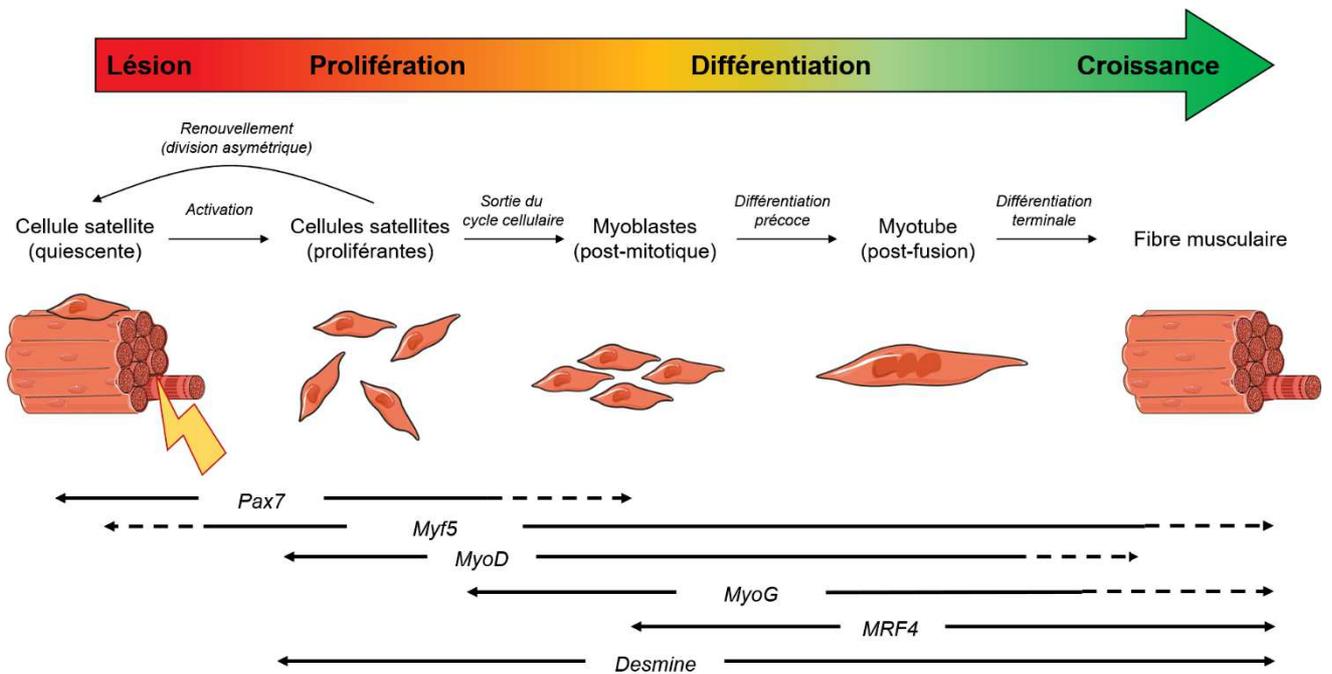


Figure 20 : Chronologie du programme génique au cours des étapes de la différenciation et de la régénération musculaire après une lésion, adaptée de Tidball et al³⁴¹

Il en découle de ces deux premiers éléments que la culture primaire limite le nombre d'interventions chez le patient (visites, anesthésies, biopsies), ce qui constitue un grand avantage vis-à-vis des contraintes éthiques relatives à la recherche et l'expérimentation chez l'humain.

En ce qui concerne le développement de molécules thérapeutiques, bien que l'utilisation de cellules C2C12 (souris) ou de cellules L6 (rat) ait permis d'effectuer des criblages de molécules candidates, il n'en reste pas moins que ces cellules sont immortalisées^{342,343}. Les conditions de culture sur de longues périodes, les différences inter-espèces dans certaines voies de signalisation et l'accumulation de modifications génétiques qu'elles véhiculent, suggèrent que les cultures primaires de cellules humaines apporteraient de meilleurs résultats sur les effets de cibles thérapeutiques chez le patient^{256,344}.

Enfin l'approche *in vitro* de cultures primaires est suffisamment flexible pour permettre la modélisation de conditions physiopathologiques pour lesquelles l'étude *in vivo* est encore difficile à mettre en place. Entre autres, la culture primaire humaine permet la modélisation de conditions susceptibles d'entraîner une dysfonction musculaire (ex : hypoxie, stress oxydant, inflammation) ou de préserver des caractères associés à la maladie acquise *in vivo* (ex : l'insulino-résistance, défaut de statut antioxydant). Cette approche permet également d'envisager l'étude des adaptations physiologiques induites par une intervention (ex : électrostimulation).

3.1.2.2. Conservation in vitro de phénotypes musculaires pathologiques acquis chez des malades chroniques

Un des points forts de la culture primaire de myotubes humains est de préserver des traits acquis *in vivo*. Cette caractéristique a majoritairement été mise en évidence dans les études relatives au diabète de type II³³⁹. En effet, un défaut de transport du glucose a aussi bien été retrouvé dans les myoblastes que les myotubes issus de patients diabétiques de type II non-insulino-dépendant^{345,346}. Ces défauts fonctionnels sont associés à la préservation des altérations moléculaires qui les sous-tendent telles que la réduction de l'activité de la glycogène synthase et l'absence de réponse à l'insuline sur l'activité de la PI3K^{347,348}. La préservation de traits associés à la pathologie a également été exploitée dans la BPCO par notre groupe de recherche^{202,203}. Il a en effet été mis en évidence une persistance du phénotype « atrophique » des myotubes issus de biopsies de patients BPCO, qui présentaient une réduction de leur diamètre comparés à des fibres formées à partir de cellules de sujets sains. La pertinence de ces observations était d'autant plus importante que cette étude montrait une corrélation entre le diamètre des fibres *in vitro* et la

CSA des fibres *in vivo* ou la force maximale volontaire du quadriceps. Ce phénotype atrophique *in vitro* est associé à la persistance d'un déséquilibre du statut antioxydant (élévation du niveau de peroxydations lipidiques et carbonylations protéiques) qui a également été relié à une surexpression des enzymes du système UPS dans une autre étude du groupe^{202,203}. A noter que l'épaisseur des myotubes BPCO *in vitro* peut être le reflet de la surexpression de la myostatine et/ou d'une altération des capacités des myoblastes à fusionner, faisant ainsi écho aux troubles de la régénération évoqués précédemment^{123,124,131,202}.

Kneppers et coll ont récemment proposé une approche *in vitro* innovante permettant d'étudier de manière plus physiologique le recrutement de myoblastes au cours de la régénération musculaire. Ce dispositif leur a notamment permis d'identifier une réduction de l'accrétion des myoblastes aux myotubes lorsque les cellules étaient cultivées en présence de myostatine ou de TNF α . A l'inverse, cette étude montre une augmentation de l'accrétion des myoblastes en présence d'IGF-1, IL-4 et IL-13, deux cytokines connues pour leur rôle dans le recrutement de myoblastes³⁴⁹⁻³⁵². Ce dispositif d'étude de la régénération musculaire a également permis la mise en évidence d'un recrutement de myoblastes en réponse à un protocole d'électrostimulation *in vitro*, modélisant ainsi les dégâts induits par l'activité physique³⁵¹. Ceci introduit le pan de la recherche qui s'intéresse aux mécanismes adaptatifs musculaires en réponse à l'exercice physique.

3.1.2.3. Modéliser l'hypoxie

Extrapoler les mécanismes d'hypoxie à une échelle cellulaire est assez complexe³⁵³. Alors que la pression partielle en oxygène *in vivo* (PpO₂) est de l'ordre de 35 mmHg au niveau musculaire au repos, la majorité des études de culture primaire sont menées dans des conditions que l'on pourrait qualifier d'hyperoxie³⁵⁴. En effet, généralement cultivées à 95% d'air ambiant (à 20% d'O₂) enrichi avec 5% de CO₂, les cellules semblent être exposées à un équivalent en PpO₂ de 142 mmHg³⁵⁵, ce qui est bien supérieur aux conditions assurant la prolifération et la différenciation myogénique situées entre 3 et 6% d'O₂ pour des cultures primaires de myoblastes humains^{356,357}. En deçà de ces valeurs, la littérature est en revanche unanime sur l'effet délétère de conditions de culture avoisinant les 1% d'O₂. Les cellules musculaires exposées à ce type de paramètres de culture présentent notamment une atrophie musculaire dépendante de l'expression des enzymes MuRF1 et Atrogin-1 associée à une altération de la synthèse PI3K/Akt/mTOR (indépendamment d'HIF-1)³⁵⁸⁻³⁶⁰. En parallèle, l'hypoxie *in vitro* entraîne un défaut de différenciation dépendante d'HIF-1, en altérant l'expression des MRFs (MyoD, Myf5 et Myogénine), ainsi

qu'en favorisant le maintien de l'état indifférencié des cellules musculaires par une interaction directe avec la voie Notch ^{358,360-363}.

3.1.2.4. Etudier le Stress oxydant et le Spill-over

La culture primaire de myotubes humains permet également de reproduire l'environnement *in vivo* dans lequel des cellules évoluent ainsi que d'étudier les processus de régénération de la fibre musculaire en réponse à des toxiques. Concernant la BPCO, différentes conditions de culture sont susceptibles de reproduire le microenvironnement – ensemble de substances en contact avec les cellules, apportées par la circulation sanguine et les tissus environnants – dans lequel les fibres musculaires et les processus de régénération se déroulent. En exposant les myotubes de patients BPCO à de l'H₂O₂, *Pomiès et coll* ont montré une plus grande réduction du diamètre des myotubes de patients comparé à des myotubes sains, traduisant une plus grande susceptibilité des cellules malades aux dégâts liés au stress oxydant²⁰³. De plus, l'exposition de ces cellules à de l'H₂O₂ a entraîné une surproduction de ROS dans ces cellules, ce qui avait déjà été identifiée par *Allaire et coll* qui avaient observé une accumulation de lipofuscine induite par le stress oxydant dans les muscles de patients BPCO²⁰⁸. A l'inverse, l'ajout d'acide ascorbique a permis d'atténuer les effets délétères du stress oxydant et d'inverser le phénotype « atrophique » des cellules de patients *in vitro*, en rétablissant un diamètre des myotubes similaire à celui des myotubes sains. L'utilisation d'un antioxydant *in vitro* a également permis de montrer un effet direct sur l'expression des enzymes Atrogin-1 et MuRF1 et sur le statut oxydatif (diminution des carbonylations protéiques et des peroxydations lipidiques) des myotubes malades²⁰³. Ces résultats appuient les effets bénéfiques additionnels sur la force musculaire et le statut antioxydant des patients, observés lors d'une supplémentation en antioxydant lors d'un REE²⁴⁴.

De nombreuses études ont d'ores-et-déjà mis en évidence le rôle délétère de cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF α ou encore l'IFN γ dans les processus de myogenèse/régénération *in vitro*, à la fois dans les cellules animales et les cellules humaines^{169,214,218,364}. Cependant, peu d'études ont étudié le rôle de ces médiateurs au sein du microenvironnement pathologique dans lequel ils interagissent. Il semble qu'une meilleure compréhension du microenvironnement dans lequel les interactions paracrines entre différents systèmes (cellules-cellules, organe-organe...) s'établissent soit désormais nécessaire. A titre d'exemple, *Rodriguez-Miguel et coll* ont testé les effets d'une dose de tétrahydrobiopterin (BH4) – co-facteur important de la biosynthèse du NO – dans l'amélioration de la fonction endothéliale chez des patients BPCO³⁶⁵. Dans cette étude, la

vasodilatation induite par le flux, qui est principalement dépendante du NO, était améliorée dans le groupe de patients traités avec du BH4. D'un point de vue mécanistique, les auteurs ont pu relier les bénéfices à une élévation de l'activité de la NO synthase vasculaire (NOS3) en exposant des cellules endothéliales en culture à du plasma de patients traités. Les observations de cette étude sont d'autant plus convaincantes que, par cette méthodologie, les doses utilisées de BH4 *in vitro* et les interactions de la molécule avec le microenvironnement pathologique sont plus représentatives des conditions *in vivo*.

En 2018, une étude s'est intéressée à la préservation de la masse musculaire chez les ours hibernants, en faisant l'hypothèse de la présence de médiateurs « protecteurs » circulants dans le sang de ces animaux, qui pourrait aider au développement de cibles thérapeutiques chez l'homme ³⁶⁶. Les auteurs ont exposé des myotubes humains à du sérum d'ours ayant été prélevé durant la période d'hibernation (WBS – *Winter Bear Serum*) et durant l'été (SBS – *Summer Bear Serum*). Ils ont constaté une augmentation significative du diamètre des myotubes en présence de WBS de plus de 21% par rapport au SBS. Cet effet hypertrophique du WBS a été relié à une réduction des processus de dégradation protéique (aussi bien l'UPS que de l'autophagie) mais également à une diminution de la synthèse protéique, conduisant à un déséquilibre en faveur d'un statut anabolique chez les myotubes exposés au WBS. Bien que les auteurs n'écartent pas la piste d'un ralentissement du métabolisme associé à un microbiote spécifique chez l'animal hibernant, l'hypothèse de la présence de médiateurs « protecteurs » est avancée.

Ainsi, la question du rôle du « *Spill-over* » dans la dysfonction musculaire chez le patient BPCO pourrait être étudiée de manière « plus physiologique » en employant une méthodologie similaire. Dans ce cadre, ce n'est pas uniquement le rôle d'un ou de plusieurs médiateurs de l'inflammation qui pourrait être étudié, mais bien le rôle du microenvironnement BPCO sur la régénération musculaire, regroupant ainsi les médiateurs de l'inflammation, les miRs circulants, les facteurs de croissance, les hormones ... dans des conditions plus proches de l'*in vivo*. A noter cependant qu'à l'inverse de cellules endothéliales qui sont directement en contact avec le sang, l'exposition de cellules musculaires à du sérum/plasma soulève des limites supplémentaires.

3.1.2.5. Modéliser l'activité physique par la stimulation électrique in vitro

Au cours des années 1970, les premières études se sont intéressées aux adaptations musculaires en réponse à l'activité physique, et ont pour cela utilisé le procédé de stimulation électrique *in vitro* (EPS – *Electrical Pulse Stimulation*). Parmi ces études, *Shainberg et Burstein* ont notamment étudié la dynamique des récepteurs à l'acétylcholine (AChR) à la membrane musculaire, dans le cadre d'une dénervation/réinnervation. Ils ont, pour la première fois, confirmé expérimentalement que la réduction de la quantité d'AChR en réponse à l'activité musculaire provenait d'une réduction de la synthèse protéique plutôt qu'une dégradation du récepteur ou de son inactivation³⁶⁷.

Plus tard, dans le milieu des années 1990, l'approche a été employée pour étudier la plasticité des fibres musculaires, notamment les variations d'expression des isoformes MHCs en réponse à différentes modalités de stimulation. *Naumann et Pette* ont montré qu'une stimulation phasique (forte intensité, durée courte), qui illustre le mode de fonctionnement des muscles tels que le triceps, promulguait l'expression des myosines rapides (MHCII), tandis qu'une stimulation tonique (faible intensité, durée longue) orientait plutôt vers l'expression de myosines lentes (MHCI) que l'on retrouve préférentiellement dans les muscles posturaux³⁶⁸.

Plus récemment, l'EPS a été employée pour reproduire et étudier les adaptations musculaires en réponse à un exercice physique. Suite à un protocole d'EPS que l'on qualifierait aujourd'hui « d'endurance-like », *Nedachi et coll* observaient, sur des cellules C2C12, des adaptations métaboliques similaires à celles induites *in vivo* par un exercice physique. Les auteurs décrivaient notamment une élévation de la consommation d'ATP et de glucose associée à une meilleure translocation des transporteurs du glucose (GLUT4) et à une activation des voies AMPK et MAPK connues pour être induites par l'activité. D'un point de vue structurel, l'étude montrait également un *shift* phénotypique des MHCs (II→I) associé à une augmentation de la synthèse protéique et une augmentation de la sarcomérisation³⁶⁹. Outre les adaptations métaboliques et structurelles, cette étude mettait également en avant le rôle endocrine du muscle en réponse à l'activité physique, observant notamment une élévation de la sécrétion de myokines telles que l'IL-6 et CXCL1 dans le milieu des cellules électrostimulées mais également dans le sang des souris ayant fait un exercice aigu sur tapis roulant. Ce dernier élément appuie la pertinence du modèle *in vitro* de contraction musculaire et notamment dans sa capacité à préserver le profil endocrine des cellules musculaires. On constate ainsi une évolution de l'utilisation de l'EPS *in vitro*, dans l'étude de la physiologie musculaire au repos, comme à l'exercice.

Cependant, ces études ayant été menées sur des cellules animales, il était nécessaire d'adapter ces approches aux tissus humains, étant donné l'importance de la régularité de l'exercice physique pour induire des adaptations musculaires durables et bénéfiques *in vivo*³⁷⁰. L'avancée majeure a été d'introduire la notion de chronicité de l'exercice dans les protocoles d'EPS *in vitro*. Bien que certains événements ne puissent encore être induits *in vitro* (ex : surexpression de GLUT4, phosphorylation de p38, synthèse du glycogène), l'utilisation de protocoles de « longue » durée (>24h) à basse fréquence a permis de reproduire de nombreuses adaptations induites par l'entraînement telles que la synthèse de PGC1 α , l'expression et la sécrétion d'IL-6 ou encore la cascade de phosphorylation impliquée dans la signalisation de l'AMPK³⁷¹⁻³⁷⁴.

Bien que ce type d'approche ne permette pas de reproduire l'ensemble des caractéristiques d'un réel entraînement *in vivo* (absence de circulation sanguine, d'innervation, de tissus conjonctifs...), plusieurs applications peuvent cependant être envisagées dans le cadre de la BPCO. L'EPS a notamment permis d'identifier de nouvelles myokines telles que les CXCL1 et CXCL5, qui semblent toutes deux impliquées dans le recrutement de neutrophiles au niveau pulmonaire chez les patients BPCO^{369,375}. On peut également émettre l'hypothèse que l'excès de CXCL1/5 au niveau pulmonaire chez les patients pourrait avoir un retentissement sur la signalisation inflammatoire au niveau musculaire. Réciproquement, les effets mineurs du REE au niveau pulmonaire pourraient être dûs à un défaut de la thérapie à rétablir l'action paracrine des muscles sur l'inflammation pulmonaire. La mise en évidence de ces effets paracrines a été rendue possible par l'exposition de différents types cellulaires – musculaire ou non – à des milieux conditionnés (MC) en EPS (milieux de culture recueillis après un protocole d'EPS, dans lequel se trouve l'ensemble des produits de sécrétion des cellules stimulées). Entre autre, l'action chimio-attractante de MC-EPS sur des monocytes a notamment été attribuée au relargage de CCL2/MCP-1 dans le milieu, illustrant la capacité du muscle à induire le recrutement de macrophages en réponse à l'exercice³⁷⁶.

L'EPS a également permis d'identifier des caractéristiques inhérentes à un groupe de patients, comme un défaut d'activation de la voie de l'AMPK dans les myotubes de patients souffrant de syndrome de fatigue chronique. Les cellules de ces patients présentaient un défaut d'adaptation de la consommation de glucose et une moindre élévation de la sécrétion d'IL-6 en réponse à l'EPS³⁷¹. De même, *Feng et coll* avaient identifié des réponses différentielles à l'EPS entre des myotubes provenant de patients en obésité sévère diabétiques ou non, comparés à des myotubes de sujets sains non-obèses.

Entre autres, l'étude a montré un défaut d'oxydation du glucose et une élévation de la synthèse du glycogène en réponse à l'EPS dans les myotubes des deux groupes de patients comparés aux cellules saines. A noter que seules les cellules de patients diabétiques en obésité sévère présentaient une diminution de l'expression des MHC-I en réponse à l'EPS³⁷⁷.

L'ensemble de ces résultats suggère que des traits phénotypiques inhérents à la pathologie sont préservés *in vitro*, et peuvent être révélés par l'électrostimulation. Ainsi, utilisée dans le cadre de l'étude de la dysfonction musculaire chez le patient BPCO, l'EPS pourrait permettre d'identifier des caractéristiques inhérentes à un groupe de patients et d'étudier les mécanismes de microlésions/désorganisation des sarcomères générés par l'exercice, qui pourraient également être impliqués dans les défauts de réponse musculaire au REE³⁷⁸⁻³⁸⁰

Résumé

Le rôle du « *Spill-over* » dans la dysfonction musculaire est une hypothèse difficile à mettre en évidence et à étudier *in vivo*, nécessitant des approches expérimentales alternatives.

La culture primaire de myotubes humains est une approche *in vitro* permettant d'étudier des processus intervenant dans la régénération musculaire.

Cette approche offre de nombreux avantages puisqu'à partir d'une biopsie, elle donne accès aux cellules souches musculaires (cellules satellites) permettant de reformer *in vitro* du tissu musculaire humain de manière quasi-inépuisable, tout en préservant les caractères physiopathologiques acquis *in vivo*.

La culture primaire de myotubes humains permet d'étudier des altérations acquises dans les cellules satellites ainsi que les effets de molécules sur la différenciation ou la régénération.

La culture primaire est une approche qui permet de modéliser des mécanismes ayant lieu *in vivo* tels que l'hypoxie ou l'exercice physique, et ouvre de nouvelles voies de recherche dans l'optimisation du REE chez le patient BPCO.

Partie 2 : Apport Scientifique

Objectifs de recherche

Au regard de la littérature, il apparaît qu'au même titre que les origines de la BPCO sont multifactorielles, la dysfonction musculaire est le résultat d'une interaction entre différents facteurs de risque extrinsèques (ex : inactivité, tabagisme, malnutrition...) et d'altérations intrinsèques (ex : inflammation de bas grade, hypoxémie, susceptibilité génétique). Si aucun facteur de risque pris individuellement ne peut à lui seul expliquer l'ensemble des mécanismes physiopathologiques impliqués, la combinaison de ces facteurs peut en revanche apporter des éléments de réponse quant à la complexité de la dysfonction musculaire et les limites de la thérapie.

De plus, la réhabilitation respiratoire n'améliore que peu la composition sanguine en facteurs du stress oxydant et n'apporte aucun bénéfice en ce qui concerne la présence de facteurs circulants inflammatoires et de certains métabolites essentiels. Il est fort probable que l'ensemble des dysfonctions tissulaires des patients BPCO soit à l'origine de cette rigidité de la signature biologique du microenvironnement circulant et pourrait témoigner d'un état de vieillissement accéléré de l'organisme. Ainsi, cette modification durable du microenvironnement systémique est susceptible d'entraîner des défauts de régénération musculaire en altérant localement les cellules satellites, les cellules souches du muscle squelettique.

Il est d'ailleurs possible que cette signature biologique du « microenvironnement BPCO » soit à l'origine de l'altération du processus de différenciation/régénération des cellules satellites conduisant à la réduction des effets bénéfiques du REE. C'est sur la base de cette hypothèse « élargie » du *spill-over* que le travail de thèse s'est attelé à l'étude du microenvironnement de la cellule satellite et à répondre à la question :

Est-ce que la BPCO est associée à un microenvironnement délétère susceptible d'être à l'origine de défauts de régénération musculaire et de limiter les effets bénéfiques du REE ?

Pour répondre à cette question, 3 grands axes de travail ont été envisagés.

I. **Identifier les anomalies intrinsèques de la cellule satellite pouvant être modulées par le microenvironnement :**

Etude 1 : Le stress oxydant régule l'autophagie dans les cultures primaires de cellules musculaires de patients atteints de bronchopneumopathie chronique obstructive (J. Cell. Physiol, 2018)

Des travaux antérieurs de l'équipe avaient montré l'existence d'un « phénotype atrophique » des myotubes dérivés de cellules satellites de patients BPCO^{202,203}. Ces études rapportaient notamment que les myotubes de patients BPCO étaient plus sensibles à un stress oxydant exogène médié par l'ajout d'H₂O₂ dans le milieu de culture que des myotubes de sujets sains. Cette réaction s'accompagnait d'une atrophie des fibres en culture et se caractérisait par une élévation de la signalisation des enzymes UPS et une augmentation des ROS intracellulaires.

Sur la base de ces résultats et de ceux rapportés par *Guo et coll*¹¹⁸ en 2013 et *Rahman et coll*³⁸¹ en 2014, nous avons formulé l'hypothèse que l'atrophie des myotubes de patients BPCO en culture pouvait également être le résultat d'une suractivation des processus autophagiques modulée par les ROS. L'objectif de cette étude a donc été de comparer les processus autophagiques entre les myoblastes et myotubes dérivés de patients BPCO et ceux provenant de sujets sains.

Nous avons ainsi pu montrer que plusieurs marqueurs de l'autophagie sont surexprimés dans les myoblastes et myotubes BPCO, et que l'exposition à un inhibiteur d'autophagie rétablit un phénotype comparable aux cellules de sujets sains. Similairement, l'exposition à un anti-oxydant (acide ascorbique) induit une réduction de la quantité des ROS intracellulaires, tout en rétablissant l'expression de marqueurs d'autophagie, et le phénotype des cellules. L'ensemble de ces résultats suggèrent un rôle médiateur des ROS dans l'atrophie dépendante de l'autophagie dans les myotubes de patients BPCO.

Cependant, les résultats de cette étude soulèvent également la question de l'origine de ces altérations, étant donné que l'exposition à des facteurs de risque extrinsèques est susceptible d'influencer la production des ROS intracellulaires. Il est donc envisageable que l'exposition chronique à un microenvironnement délétère

puisse induire l'apparition d'un « phénotype BPCO » des myotubes *in vitro*. Nous avons donc abordé cette question dans le deuxième objectif de ces travaux.

II. Identifier le rôle du microenvironnement BPCO dans la genèse de dysfonctions de la cellule satellite :

Etude 2 : Effets d'un microenvironnement humain sur la différenciation de myoblastes humains (Plos One, 2019 – En révision)

Afin d'étudier l'implication des facteurs circulants dans la genèse des dysfonctions musculaires chez le patient BPCO, il a été nécessaire de définir au préalable un modèle d'étude adéquat. Cette mise au point a été un point crucial de la thèse car, au regard de la littérature, peu d'études se sont intéressées aux éléments de variabilité biologique inhérente à l'utilisation de tissus humains (cellules ou sérum). En effet, la majorité des études sont menées avec des tissus animaux immortalisés et/ou avec des milieux enrichis en sérum animal. Cependant, il nous paraissait nécessaire de standardiser les méthodes d'analyses, afin d'assurer la bonne transposition des mécanismes observés *in vitro* aux processus *in vivo* chez l'homme.

L'objectif de cette étude était d'étudier la variabilité de la différenciation de myotubes humains sains exposés à différents types de séra en analysant la variabilité dépendante des cellules et du sérum.

Dans cette seconde étude, nous avons défini les conditions méthodologiques permettant d'étudier de manière reproductible le rôle du microenvironnement dans la différenciation musculaire en tenant compte de la variabilité biologique des tissus utilisés. De plus, nous avons apporté des éléments de réponse validant le rôle délétère du microenvironnement BPCO sur la différenciation de myotubes sains.

Cependant, cette étude n'a pas permis d'apporter d'éléments mécanistiques de l'effet délétère du microenvironnement BPCO sur la différenciation des myotubes sains. Ceux-ci ont été abordés plus en détail dans l'étude 3.

Etude 3 : Effets du microenvironnement BPCO en fonction de la sévérité de la maladie sur la différenciation de myoblastes humains sains

Afin d'étudier les mécanismes conduisant aux effets délétères du sérum de patients BPCO sur la différenciation de myoblastes sains, nous avons débuté une étude visant à identifier des éléments permettant de relier les effets du microenvironnement *in vitro* à la sévérité de la maladie.

L'objectif de cette étude était d'évaluer une gradation possible des effets délétères, avec pour hypothèse que la composition du microenvironnement est graduellement détériorée par la présence anormale, tant en terme quantitatif que qualitatif, de facteurs délétères (cytokines, chimiokines, miRNA, microparticules...). Pour cela, nous avons exposé des myotubes humains sains à du microenvironnement de patients BPCO regroupés en sous-groupes de sévérité (basés sur la classification GOLD).

Nos résultats confirment la présence d'une gradation des effets du sérum de patients sur la différenciation des myotubes sains en fonction de la sévérité, cependant les effets observés sont opposés entre les différents sous-groupes formés : alors que le sérum des sujets les plus légers a bien eu un effet atrophique (comme observé dans l'étude 2), le sérum des sujets les plus sévères a eu un effet contraire. Cet effet différentiel du sérum des patients selon la gravité de la maladie est également supporté par des variations similaires des profils d'expression de plusieurs marqueurs de la différenciation.

Ces résultats indiquent une évolution de la composition du sérum des patients avec la sévérité de la maladie, qui pourrait induire une évolution de la sensibilité du tissu musculaire à ces facteurs délétères au cours de la maladie.

III. Rôle du microenvironnement dans les effets bénéfiques limités du réentraînement à l'effort chez le patient BPCO :

Etude 4 : Le réentraînement à l'effort ne permet pas d'inverser les signaux atrophiques du sérum de patients BPCO sur les myotubes sains in vitro

Je me suis également intéressé au rôle du microenvironnement vis-à-vis du REE. Alors que les effets bénéfiques du REE sur la dyspnée, la tolérance à l'effort et la qualité de vie sont désormais admis²³², il est nécessaire d'identifier les éléments qui

limitent ses effets bénéfiques tant en terme quantitatif que dans la durée. L'inflammation et le stress oxydant étant moins bien contrôlés chez les patients BPCO, il est possible que le REE ne permette pas de rétablir une signature biologique propice aux adaptations bénéfiques^{206,333,382}.

C'est pourquoi nous avons émis l'hypothèse que ces défauts d'adaptation du microenvironnement BPCO, en réponse au REE, se répercutaient sur les processus de différenciation/régénération des cellules satellites. L'objectif de cette étude était donc de comparer les effets du microenvironnement après REE de sujets sains ou de patients BPCO sur la différenciation de myoblastes humains sains.

En exposant des myoblastes sains à du sérum de patients BPCO prélevé avant ou après un REE de 5 semaines, nous avons observé que le sérum de patients post-REE induit une élévation des marqueurs cataboliques dans les myotubes sains. Ces résultats corroborent les études identifiant une inflammation mal-contrôlée chez les patients BPCO comme un mécanisme pouvant limiter les adaptations bénéfiques induites par le REE³³³.

En revanche, ces résultats soulèvent le besoin d'étudier de manière plus précise les interactions entre cellules satellites et microenvironnement au cours de la différenciation musculaire dans le cadre du REE. La dernière étude de ce travail de thèse s'est ainsi focalisée sur l'utilisation d'un modèle *in vitro* mimant les réponses physiologiques à l'exercice afin d'étudier ces interactions.

Etude 5 : L'électrostimulation in vitro révèle les défauts d'adaptation musculaire des myotubes de patients BPCO induits par l'exercice

Malgré d'importants progrès dans la prise en charge des patients au cours d'une RR, les bénéfices induits par la thérapie restent encore incomplets. Ceci souligne le besoin de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans les défauts d'adaptation induits par le REE et d'identifier les déterminants de la non-réponse de près d'un tiers des patients.

Bien que la littérature ne soit pas exhaustive, l'électrostimulation (EPS) *in vitro* a déjà permis de reproduire les réponses physiologiques de l'exercice et de révéler la persistance de défauts d'adaptation des cellules satellites provenant de malades chroniques (fatigue chronique, diabète)^{371,377}.

Nous avons donc fait l'hypothèse que l'EPS permettrait d'identifier des défauts d'adaptation musculaire sous-jacentes aux limites des effets bénéfiques du REE dans les myotubes de patients BPCO. L'objectif était donc d'étudier les différences de réponses à l'électrostimulation entre des cultures primaires de myotubes de patients BPCO et de sujets sains soumises à une EPS.

Nos résultats ont permis de mettre en évidence que l'EPS avait des effets opposés entre les myotubes sains et BPCO, avec des anomalies dans la réponse à la stimulation électrique pour les cellules malades. L'EPS amplifie ainsi le phénotype atrophique des myotubes BPCO en culture, potentiellement par un défaut de recrutement des myoblastes résidents, un état d'hypercatabolisme post-stimulation et un défaut d'adaptation du métabolisme oxydatif.

Ceci suggère que des défauts d'adaptation dans les myotubes BPCO pourraient être impliqués dans les limites des effets bénéfiques du REE *in vivo*, ce qui constitue une approche innovante dans la recherche d'optimisation du REE.

En conclusion, les cinq études constituant ce travail de thèse abordent de manière globale le rôle d'interface du microenvironnement entre les facteurs extrinsèques et les signaux intrinsèques de la cellule satellite dans la genèse d'une dysfonction musculaire chez le patient BPCO. Ce travail apporte également de nouveaux éléments quant aux effets limités du REE sur la régénération musculaire, à travers ce même microenvironnement. Enfin, ces études proposent de nouveaux éléments de méthodologie relatifs à l'utilisation de tissus humains *in vitro*, ainsi qu'une approche innovante dans la modélisation de l'exercice physique permettant d'aborder de nouvelles voies d'optimisation de la RR chez le patient BPCO (voir schéma ci-dessous).

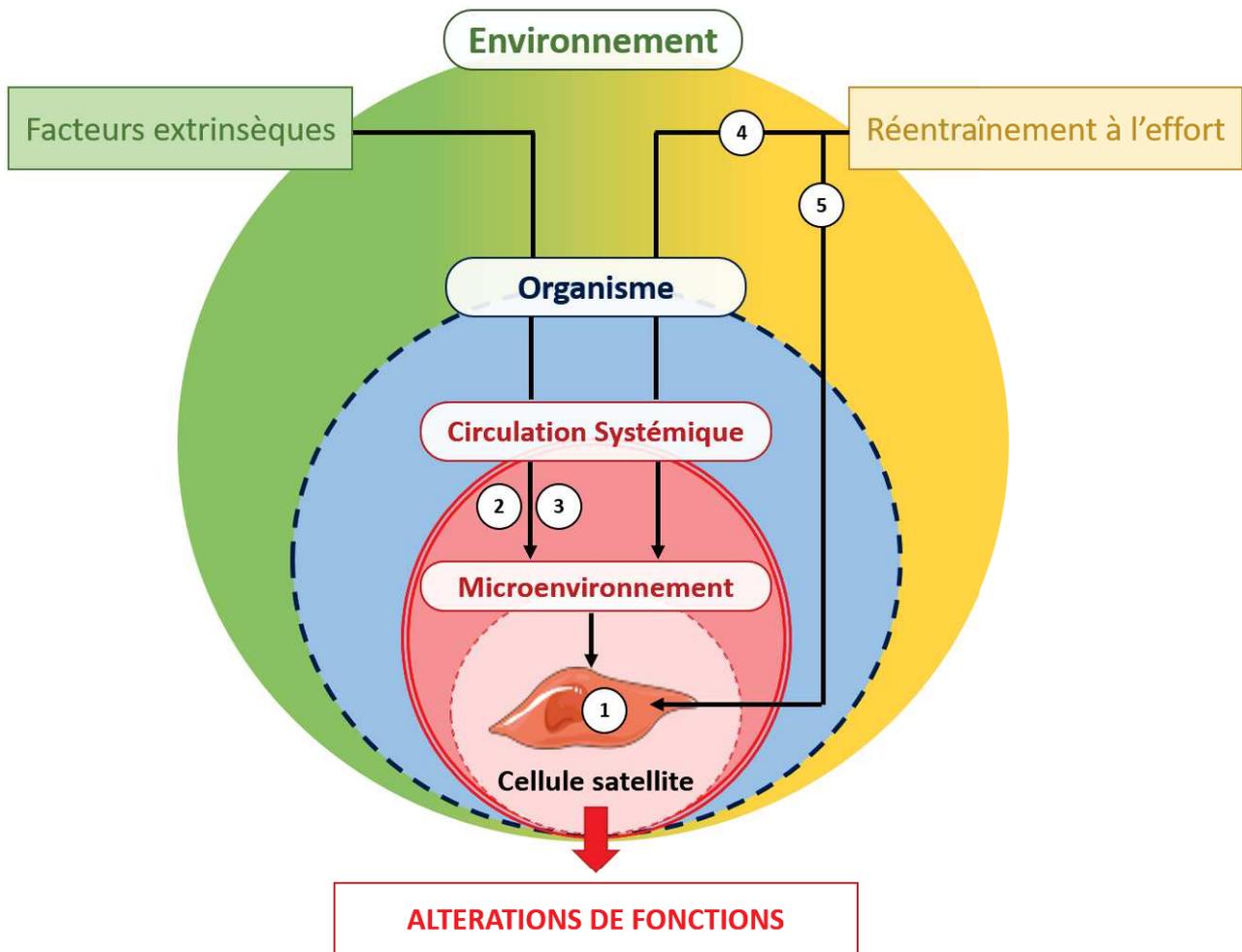


Figure 21 : Représentation du cadre scientifique des études 1 à 5 du manuscrit de thèse

Methodologies

Fiche technique 1 : Critères d'inclusion des sujets et constitution d'une banque d'échantillons sériques

I. Principe :

L'établissement d'une banque de tissus consiste à rassembler, tracer et cryopréserver des tissus dans le but de recherches ultérieures. Dans le cadre de nos expérimentations, nous avons constitué une banque d'échantillons sériques à partir de sujets ayant participé à des études antérieures.

II. Mentions légales :

Pour l'ensemble des études du manuscrit, les comités d'éthiques de protection des personnes (CPP) de :

- L'hôpital Universitaire de Marseille (CPP Sud Méditerranée I - 2014-A01965-42)
- L'hôpital Universitaire de Montpellier (CPP Sud Méditerranée IV 2011-A00842-39, 2013-A01199-36, Comité Local d'Ethique Recherche 2017_CLER-MTP_07-19)

ont approuvé les études, et l'ensemble des participants aux études initiales ont donné leur consentement pour que les échantillons récoltés puissent être utilisés pour des études ancillaires (NCT01942889 ; NCT02794142 ; NCT03197909 ; NCT02040363). L'ensemble des protocoles de recherche ont été menés en accord avec les bonnes pratiques cliniques décrites dans la déclaration d'Helsinki et les recommandations Européennes.

III. Critères d'inclusions des sujets :

Dans les différentes études du manuscrit, les tissus utilisés proviennent de sujets sains sédentaires et de patients BPCO, préservés dans une banque de tissus constituée par l'équipe à partir de précédentes études cliniques, sans lien avec mes travaux de thèse.

Les sujets sains ont été recrutés sur la base des critères suivants :

- Âge compris entre 40 et 80 ans
- Aucune maladie diagnostiquée
- Sédentaire ou faible activité physique hebdomadaire (< 150 min d'activité physique d'intensité modérée à vigoureuse)

Les sujets BPCO, harmonisés sur l'âge, ont été recrutés sur la base des critères suivants :

- Dyspnée (évaluée avec le questionnaire mMRC), toux chronique et/ou production d'expectorations, et/ou historique d'une exposition à des facteurs de risque de la BPCO
- Diagnostic confirmé par une spirométrie indiquant une réduction des flux bronchiques (VEMS < 80%) et une obstruction (VEMS/CVF < 70%)

Les critères de non-inclusion étaient :

- L'existence d'une autre maladie respiratoire
- D'une comorbidité majeure et/ou décompensée
- Exacerbation < 4 semaines

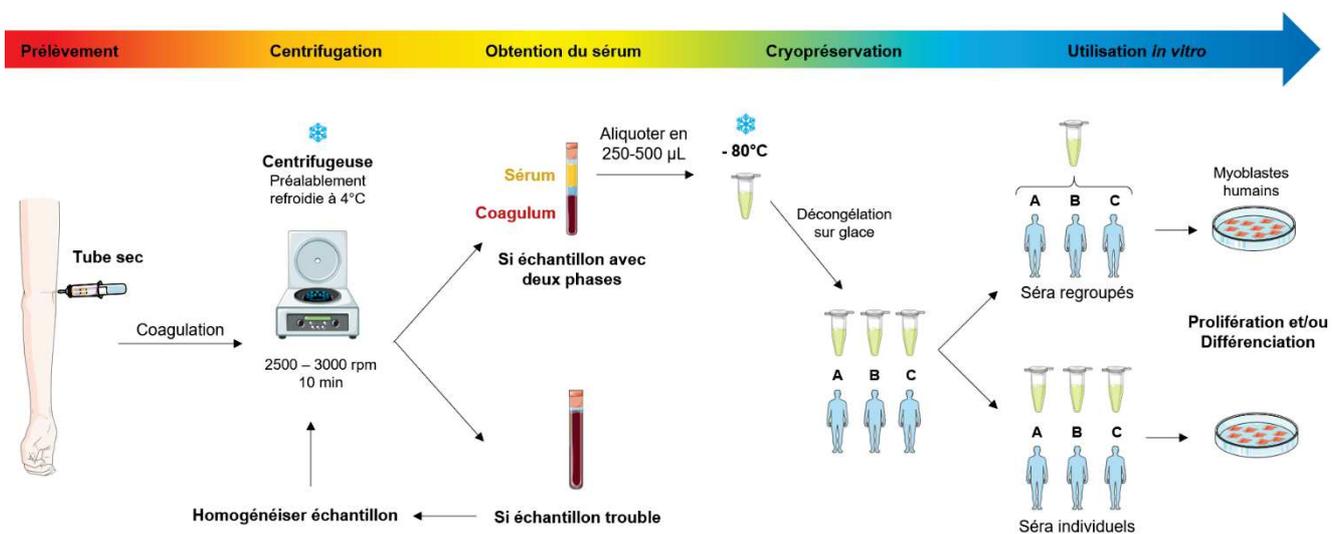
Après interrogatoire et examen clinique, tous les patients ont effectué les tests cliniques au laboratoire ou dans des centres de réhabilitation respiratoire (voire fiche n°2 « Evaluations cliniques »).

IV. Préparation des échantillons sériques :

- Le prélèvement sanguin veineux est effectué de manière stérile dans un tube sec, généralement de 6ml
- Directement après avoir été prélevé, le tube est placé à 4°C durant 15 à 30 min afin de s'assurer que la coagulation soit complète
- Le tube est ensuite centrifugé 10 min, entre 2500 à 3000 rpm dans une centrifugeuse préalablement refroidie à 4°C
- A la fin de la centrifugation :
 - o Si le prélèvement présente deux phases : la partie supérieure (sérum) est prélevée avec une pipette 1000 en faisant attention de ne pas aspirer la partie inférieure (coagulum)
 - o Si le prélèvement est trouble et ne présente pas deux phases distinctes : le prélèvement est agité avec une pipette 1000 afin d'être homogénéisé et centrifugé à nouveau. Ceci arrive lorsque le sang prélevé est très visqueux
- Le sérum est aliquoté par 250 à 500µL dans des tubes Eppendorf™ et cryopréservé à -80°C pour une utilisation ultérieure

Dans le cadre des études 2, 3 et 4, les myoblastes humains ont été exposés à du sérum de différents sujets, pouvant être regroupés. La préparation des échantillons s'est effectuée de la manière suivante :

- Les différents échantillons nécessaires sont d'abord décongelés lentement sur glace
- Une fois décongelés, les tubes sont centrifugés durant 1 min à 3000 rpm
 - o Pour les échantillons individuels, les prélèvements peuvent être utilisés directement *in vitro*
 - o Pour les échantillons utilisés de manière regroupée, les différents prélèvements sont regroupés dans un tube complémentaire (v/v) à l'aide d'une pipette 200, puis utilisés *in vitro*



(Pour les procédures relatives à la cryopréservation de biopsies musculaires et de myoblastes humains, se reporter aux fiches techniques n°4 « Biopsie musculaire avec aiguille de Bergström modifiée » et n°6 « Purification de myoblastes humains »)

Fiche technique 2 : Biopsie musculaire avec aiguille de Bergström modifiée

I. Principe :

La biopsie musculaire est un geste pratiqué sous anesthésie locale au niveau du muscle vaste externe, l'un des quatre chefs musculaires du quadriceps de la cuisse, selon la technique de biopsie à l'aiguille basée sur la méthode de Bergström³⁸³. Cette procédure vise à prélever un fragment de tissu musculaire suffisant pour des analyses histologiques, biochimiques et de biologie moléculaire.

II. Matériels et Méthodes :

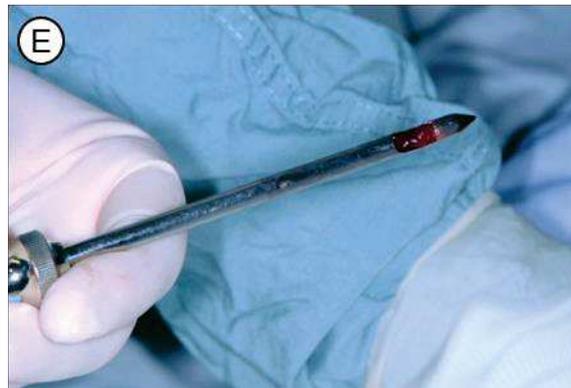
La technique de biopsie musculaire a également été décrite par *Shanely et coll*³⁸⁴, en 2014. Cependant la procédure suivante est pratiquée avec un trocard à usage unique KBM 6/10 de 5 mm de diamètre (Laurane Médicale, France, photo ci-contre) développé spécifiquement à la demande de notre équipe, reproduisant une aiguille de Bergström. La biopsie est effectuée dans des conditions d'asepsie rigoureuses



- (A) : Le sujet est anesthésié localement à environ 15 cm au-dessus de la rotule par injection de 5-8 ml de Lidocaïne chlorhydrate 2%, sans dépasser l'aponévrose car la Lidocaïne est myo-toxique. Une recherche d'antécédents allergiques aux anesthésiants de type « -caïne » permet de réduire le risque de réaction allergique à la lidocaïne
- (B) : Une incision d'environ 1 cm de l'aponévrose est pratiquée au scalpel parallèlement à l'axe du fémur



- (C) : Après avoir repéré l'aponévrose avec une aiguille à usage unique, (D) le trocart est avancé à 1 cm au-delà de l'aponévrose. L'échantillon est prélevé après avoir été aspiré à l'aide d'une seringue de 50 ml reliée par une tubulure stérile à usage unique (20 cm), insérée dans la partie externe du trocart interne. Plusieurs passages sont possibles



- (E) : L'échantillon musculaire (250-300 mg), pourra être subdivisé et congelé de différentes manières selon les analyses ultérieures :
 - o Une congélation progressive dans un cryotube contenant du sérum de veau foetal/10% DMSO et placé dans un container de congélation Mr Frosty (Nalgene Fisher Scientific, Pittsburg, PA, Etats-Unis) jusqu'à -80°C, puis conservé à l'azote liquide, afin de préserver l'intégrité cellulaire et garantir la qualité de l'isolation des cellules satellites
 - o Une congélation rapide dans l'azote pour des analyses biochimiques et de PCR
 - o Une congélation rapide sur lamelle dans de l'isopentane (pré-refroidi à l'azote liquide), afin de préserver la forme des tissus, avec conservation à -80°C pour des analyses histologiques

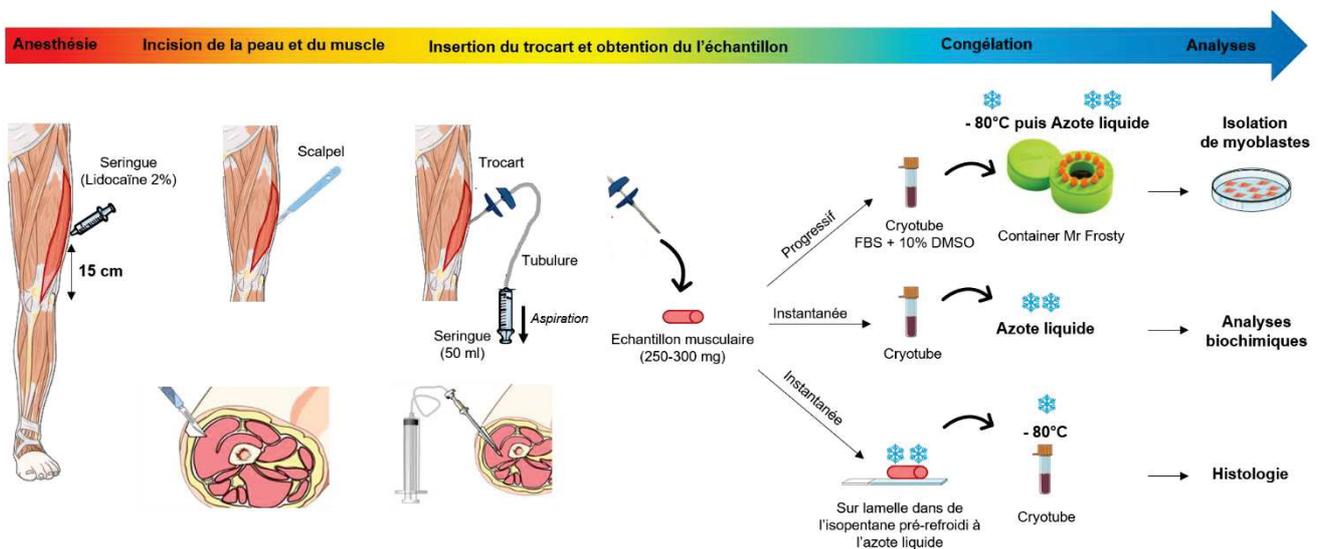
- Le derme est ensuite refermé à l'aide de sutures cutanées adhésives stériles composées de bandelettes en support microporeux renforcé de fibres de polyester et enduit d'un adhésif hypoallergénique.

Tolérance et risque du geste :

Le geste de biopsie, pratiqué par des équipes expertes, est généralement bien toléré par le sujet. Des sensations douloureuses peuvent être ressenties et peuvent atteindre 4-6 sur 10 sur une échelle visuelle analogique³⁸⁵. La pratique régulière de cette technique par nos équipes a rendu l'effet douloureux mineur.

Pour prévenir la formation d'hématome, une compression est faite en regard de l'incision après avoir placé une compresse sur l'incision, recouverte d'un pansement film transparent et semi-perméable en polyuréthane, avec adhésif acrylique hypoallergénique, sensible à la pression.

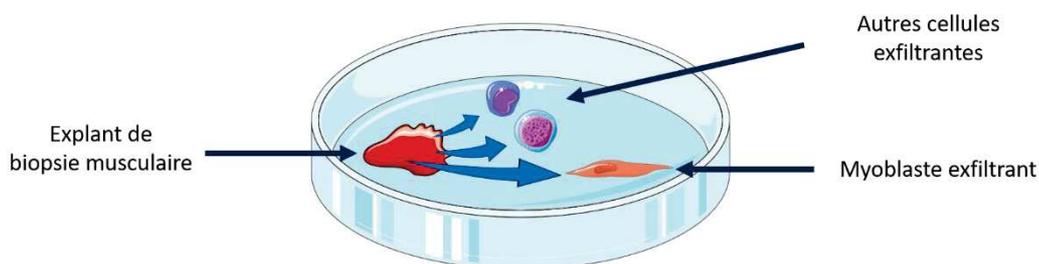
L'incision au niveau du derme peut laisser une petite cicatrice peu visible.



Fiche technique 3 : Mise en culture d'explants de biopsies musculaires humaines & obtention des cellules totales

I. Principe :

Mettre en culture des explants de biopsies musculaires humaines afin d'isoler les myoblastes s'exfiltrant des explants.



II. Réactifs & Solution :

Réactifs	Fournisseur / Référence	Conservation / Ouverture
Milieu de culture Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Sigma / D6546	4°C
Phosphate Buffer Saline (PBS)	Sigma / D8537	4°C
Antibiotique Pénicilline/Streptomycine (P-S)	Sigma / P4458	-20°C / 4°C
Sérum de Veau Foetal (SVF)	Dominique Dutscher / S11971S1810	-20°C / 4°C
Ultroser G	Pall Biosepra Corporation	-20°
HEPES	Sigma / H0887	4°C
Matrigel	Corning <i>via</i> VWR / 734-1100	-20°C
Dispase	BD Bioscience / 354235	-20°C
Trypsine	Sigma / T4049	-20°C
Solutions	Composition	
Milieu complet	DMEM / 10% P-S / 20% SVF / 0,5% Ultroser G / 20 mM d'HEPES	
Milieu de prolifération	DMEM / 10% P-S / 20% SVF / 0,5% Ultroser G	
Milieu de congélation	SVF / 10% Diméthylsulfoxyde (DMSO)	
Trypsine diluée	PBS / 10% trypsine	
Matrigel dilué	DMEM + Matrigel (6mg/ml)	

III. Procédure :

L'ensemble de la procédure doit être menée sous hotte à flux laminaire verticale

1. Mise en culture :

- Mettre le cryotube contenant les explants de biopsie musculaire (conservé à l'azote liquide) à décongeler à l'incubateur (37°C / Air ambiant / 5% CO₂ / Humidifié)
- En parallèle, mettre à refroidir sur glace une boîte de culture 35 mm
- Une fois les explants décongelés, retirer le milieu de congélation et effectuer 2 lavages avec du milieu complet directement dans le cryotube
- A l'aide de cônes stériles, répartir les explants dans la boîte de culture *coatée* collagène I diamètre 35 mm préalablement refroidie, en prenant garde d'espacer les explants, sans les coller au bord de la boîte
- En ayant préalablement refroidi des cônes, recouvrir goutte-à-goutte les explants avec du Matrigel dilué
- Placer la boîte contenant les explants et le Matrigel à l'incubateur 30 min
- Après 30 min, recouvrir délicatement les explants avec 2 ml de milieu complet

Après quelques jours de culture, des cellules se sont exfiltrées des explants et doivent être récupérées.

2. Récupération des cellules totales :

- Aspirer le milieu de culture
- Ajouter 2,5 mL de Dispase et mettre à l'incubateur pendant 2 heures.
- Après incubation, récolter l'ensemble des cellules dans un tube. Si des cellules sont encore adhérentes, laver plusieurs fois avec du milieu DMEM / 20% SVF afin de récupérer le reste des cellules (si nécessaire trypsiner)
- Centrifuger le tube contenant les cellules à 1100 rpm pendant 5 min
- Aspirer le surnageant et rincer à nouveau le culot avec du milieu DMEM / 20% SVF
- Centrifuger à nouveau à 1100 rpm pendant 5 min
- Reprendre le culot dans du milieu de prolifération
- Ensemencer les cellules dans une boîte de culture *coatée* collagène I de 100 mm

3. Passage des cellules :

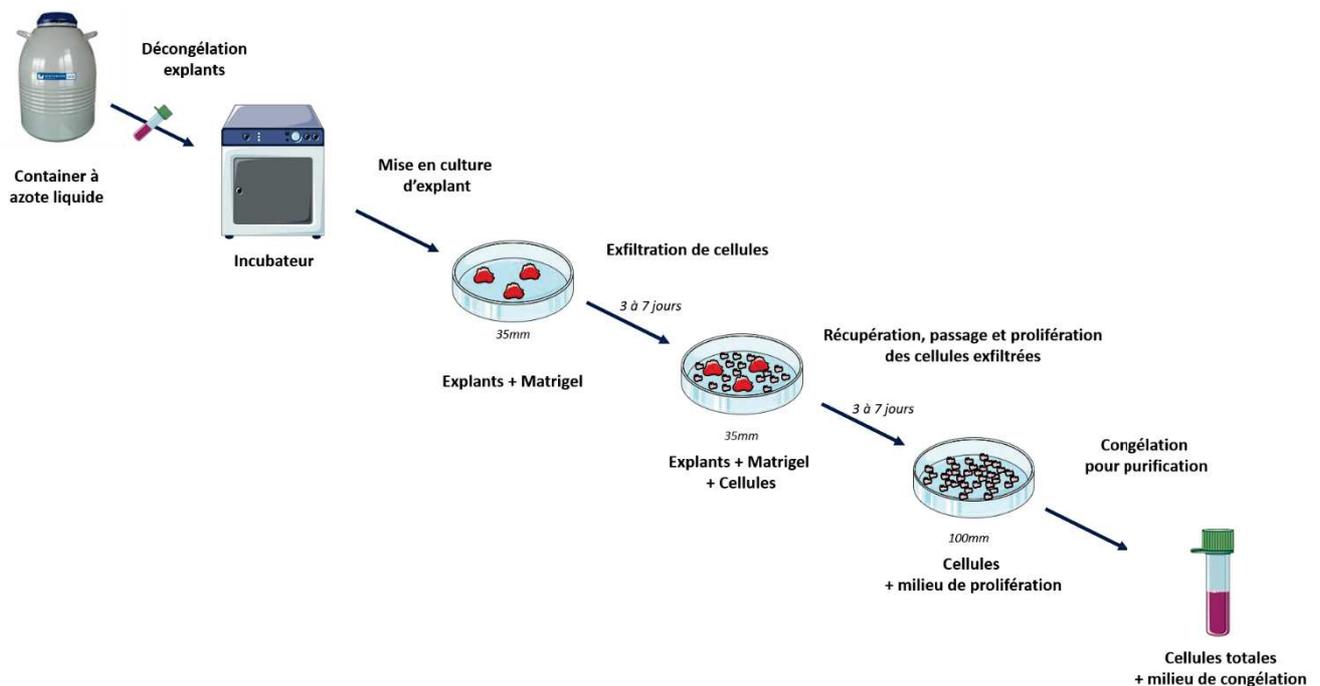
Après 48 à 72 heures de prolifération, passer les cellules totales à sous-confluence :

- Aspirer le milieu de culture
- Ajouter 4 mL de trypsine et placer 5 min à l'incubateur
- Récolter les cellules trypsinées avec du milieu de prolifération
- Centrifuger 5 min à 1100 rpm
- Resuspendre le culot avec du milieu de prolifération
- Répartir les cellules dans des boîtes de culture *coâtées* collagène I de 100 mm

Après 48 à 72 heures de prolifération, congeler les cellules à confluence :

- Trypsiner les cellules, centrifuger 5 min à 1100 rpm
- Reprendre le culot de cellules dans du milieu de congélation
- Prévoir 2 cryotubes par boîtes de culture *coâtées* collagène I de 100 mm

Ces cryotubes constituent les cellules totales nécessaire à la purification des myoblastes.



Fiche technique 4 : Purification des myoblastes humains

I. Principe :

Le but est d'isoler les myoblastes à partir des cellules totales issues de la mise en culture d'explants (cf. Fiche technique 5).

II. Réactifs et solutions :

Réactifs	Fournisseur / Référence	Conservation / Ouverture
Milieu de culture Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Sigma / D6546	4°C
Phosphate Buffer Saline (PBS)	Sigma / D8537	4°C
Bovine Serum Albumine (BSA)	Euromedex / 04-100-810-C	4°C
EDTA	Sigma / E6758	4°C
Cell Dissociation 1X (Non-enzymatique)	Sigma / C5914	4°C
Anticorps souris anti-CD56 humain	BD Bioscience / BD559043	4°C
Microbilles couplées à des IgG mouton anti-souris	Miltenyi Biotec / 130-048-402	4°C
Colonne de séparation magnétique (MACS)	Miltenyi Biotec / 130-042-201	4°C
Solutions	Composition	
Milieu de prolifération	DMEM / 10% P-S / 20% SVF / 0,5% Ultrosor G	
DMEM/BSA	DMEM / 0,5% BSA (préalablement filtrée 0,22 µm)	
PBS/BSA	PBS / 0,5% BSA (préalablement filtrée 0,22 µm)	
PBS/BSA/EDTA	PBS / 0,5% BSA (préalablement filtrée 0,22 µm) / 2mM EDTA	

III. Procédure :

La purification peut être effectuée directement à partir de cellules totales de l'explant, ou à partir d'un cryotube de cellules totales préalablement décongelé 24 heures auparavant dans une boîte de culture *coatée* collagène I de 100 mm.

1. Préparation de la suspension cellulaire :

- Aspirer le milieu de la boîte de culture *coatée* collagène I de 100 mm contenant les cellules totales
- Ajouter 4 ml de DMEM/BSA dans la boîte
- Incuber avec l'anticorps anti-CD56 dilué au 1/1000^e durant 30 min à l'incubateur

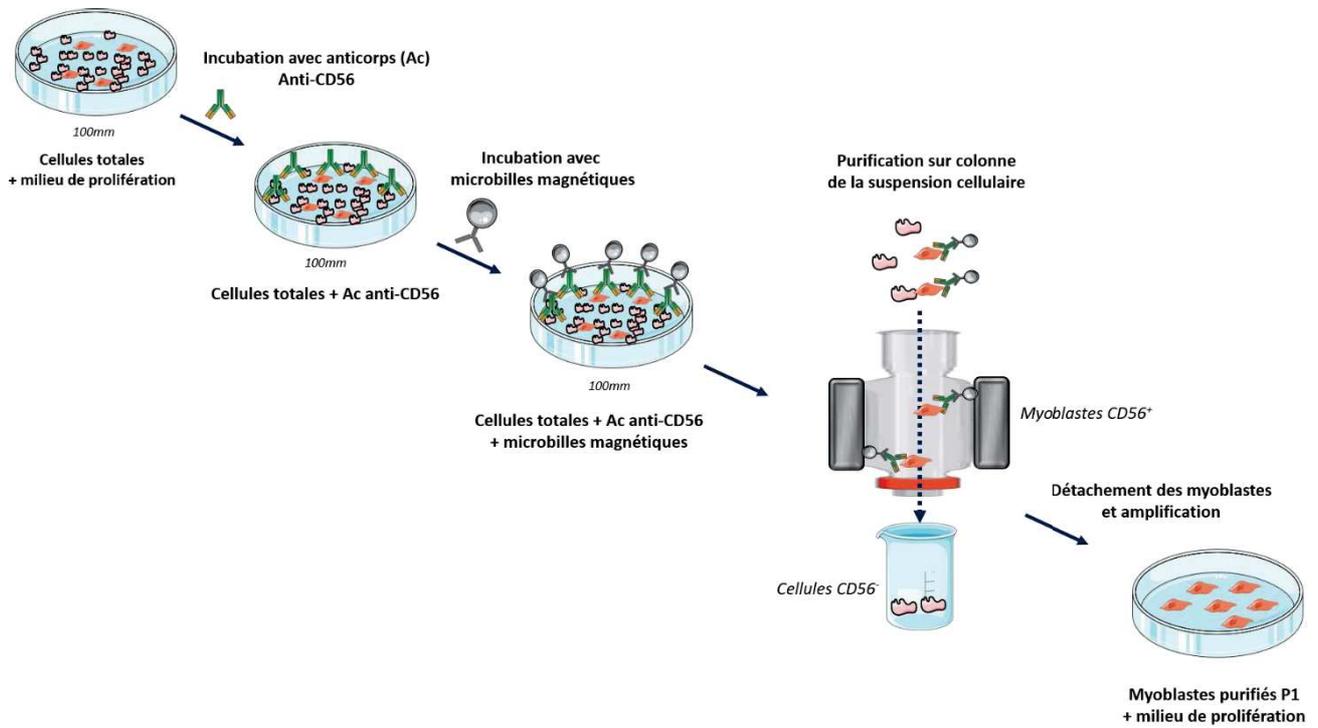
Mettre la solution de Cell Dissociation 1X à température ambiante durant l'incubation.

- Aspirer le milieu et incuber les cellules avec 4 ml de Cell Dissociation durant 20 min
- Récupérer le surnageant contenant les cellules (si nécessaire, laver 2-4 fois avec 2 ml de PBS/BSA/EDTA afin de récupérer toutes les cellules)
- Centrifuger 5 min à 1100 rpm
- Aspirer le surnageant et resuspendre avec du PBS/BSA/EDTA
- Centrifuger à nouveau 5 min à 1100 rpm
- Aspirer délicatement le surnageant
- Resuspendre délicatement avec 80 µl de PBS/BSA/EDTA
- Ajouter 20 µl de microbilles (dilution 1/5^e)
- Homogénéiser délicatement (sans bulles)
- Laisser incuber 5 min à 4°C (ces deux étapes sont à réitérer 3 fois)
- Reprendre les cellules dans 8 ml de PBS/BSA/EDTA, homogénéiser en évitant de faire des bulles
- Centrifuger 5 min à 1100 rpm
- Aspirer le surnageant et resuspendre les cellules dans 500 µl de PBS/BSA/EDTA

2. Equilibrage de la colonne et purification :

- Placer une colonne MACS stérile sur le support aimanté avec un flacon poubelle sous la colonne
- Hydrater la colonne avec 1 ml de PBS/BSA/EDTA
- Faire passer la suspension cellulaire dans la colonne. Si nécessité de récupérer les cellules CD56⁻ placer un tube 15 ml/50 ml sous la colonne, sinon laisser la poubelle
- Laver 3 fois la colonne avec du PBS/BSA
- Retirer la colonne de l'aimant et la placer au-dessus d'un flacon contenant du milieu de prolifération (amortir la chute des cellules)
- Afin de recueillir les cellules, ajouter 1 à 2 ml de PBS/BSA à la colonne et presser fortement et rapidement le piston de la colonne
- Compléter à 10ml de milieu de prolifération
- ensemencer une boîte de culture *coatée* collagène I de 100 mm.

Ceci constitue le passage 1 (P1) des cellules purifiées, qui sont généralement amplifiées une fois avant congélation (P2) pour conservation.



Fiche technique 5 : Culture primaire de myoblastes humains

I. Principe :

La culture primaire consiste à constituer *in vitro* une monocouche de myoblastes humains dérivés d'une biopsie musculaire et d'induire leur différenciation en myotubes.

II. Réactifs et solutions :

Réactifs	Fournisseur / Référence	Conservation / Ouverture
Milieu de culture Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Sigma / D6546	4°C
Phosphate Buffer Saline (PBS)	Sigma / D8537	4°C
Ultroser G	Pall Biosepra Corporation	-20°
Antibiotique Pénicilline/Streptomycine (P-S)	Sigma / P4458	-20°C / 4°C
Trypsine	Sigma / T4049	-20°C
Solutions		
	Composition	
Milieu de prolifération	DMEM / 10% P-S / 20% SVF / 0,5% Ultroser G	
Milieu de différenciation	DMEM / 10% P-S / 2% SVF	
Trypsine diluée	PBS / 10% trypsine	

III. Procédure :

Cette fiche technique regroupe l'ensemble des procédures relatives à la manipulation de myoblastes dans le but de les amplifier, congeler ou différencier. Similairement à la purification de myoblastes, la culture peut débuter soit à partir de cellules P1 soit à partir d'une ampoule de cellules P2 décongelées etensemencées 24-48h au préalable.

L'ensemble des procédures est effectué avec des solutions à une température de 37°C.

1. Trypsination :

Pour les expérimentations, l'ensemencement initial se fait à partir d'une ou plusieurs boîtes de culture *coatées* collagène I de 100mm sous-confluente.

- Retirer le milieu de prolifération
- Faire 1 à 2 lavages PBS
- Ajouter 4 ml de solution de trypsine diluée, et mettre à l'incubateur 5 min
- Récolter la suspension cellulaire dans du milieu de prolifération

- Centrifuger 5 min à 1100 rpm
- Aspirer le surnageant

2. Congélation :

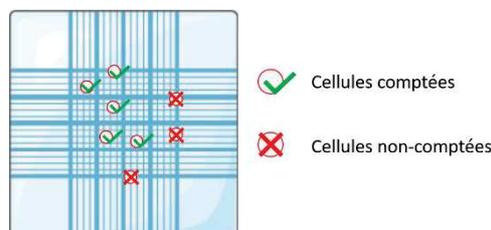
Pour congeler les cellules :

- Re-suspendre les cellules dans du milieu de congélation
- Aliquoter dans des cryotubes
- Placer les cryotubes 24h à -80°C dans un container de congélation Mr Frosty (Nalgene Fisher Scientific, Pittsburg, PA, Etats-Unis), puis conserver à l'azote liquide

3. Comptage :

Pour les expérimentations, l'ensemencement initial doit être identique, nécessitant une étape de comptage :

- Prélever 7 µl de suspension cellulaire et injecter dans chaque chambre de comptage d'une cellule de Thoma
- Sous microscope, compter l'ensemble des cellules présentes dans une chambre en excluant les cellules touchant deux des quatre bords de la chambre (voir schéma ci-dessous). Moyenner le nombre de cellules des 2 chambres



4. Ensemencement :

- Re-suspendre les cellules
- Prélever le volume de suspension nécessaire pour ensemercer les boîtes de culture *coatées* collagène I à une densité de 5 000/cm², soit :
 - o 47 500 Φ ensemencées pour une boîte 35 mm
 - o 140 000 Φ ensemencées pour une boîte 60 mm
 - o 392 000 Φ ensemencées pour une boîte 100 mm
- Ajouter du milieu de prolifération
- Homogénéiser la répartition des cellules dans chaque boîte
- Laisser proliférer 48h à l'incubateur

5. Différenciation :

La différenciation est induite lorsque les cellules atteignent une confluence supérieure à 80% (sans atteindre 100%, afin de préserver les capacités myogéniques des myoblastes)

- Retirer le milieu de prolifération
- Laver 1-2 fois avec du PBS
- Ajouter du milieu de différenciation
- Le milieu est renouvelé tous les 2 jours

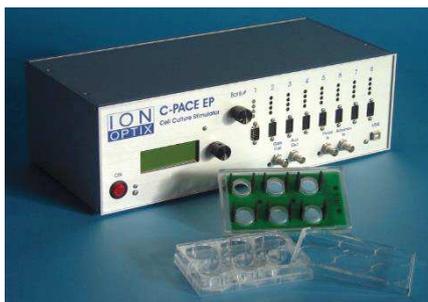
Pour les expérimentations nécessitant du sérum humain, le SVF est remplacé par 2% de sérum humain.

Fiche technique 6 : Electrostimulation *in vitro*

I. Principe :

L'électrostimulation (EPS) *in vitro* consiste à appliquer aux cellules en culture un courant électrique de champ, simulant les effets d'une contraction musculaire.

II. Matériels :



Matériel	Fournisseur
C-Pace EP	IonOptix
C-Dish 6 puits	IonOptix

Le couvercle de stimulation C-Dish 6 puits (comportant 6 doublets d'électrodes en carbone) et le générateur C-Pace EP forment un dispositif permettant d'appliquer une stimulation électrique programmable à des cellules (excitables) en culture. Plusieurs paramètres de stimulation sont possibles :

- Stimulation basique régulière ou en séquence (5 étapes programmables au maximum)
- Durée de pulsation : 0,4 à 24 ms
- Voltage : jusqu'à ~40V à une intensité constante de 240 mA

Outre ces paramètres, ce dispositif permet également d'implémenter un paramètre d'irrégularité de stimulation (modifiant aléatoirement le temps entre 2 pulsations) et peut être synchronisé avec différents systèmes d'enregistrements/analyses ainsi qu'aux systèmes d'étirement type Uniflex de *Flexcell*[®].

III. Procédure :

L'EPS est généralement appliquée sur des cellules adhérentes, notamment pour modéliser l'exercice physique dans le cadre de nos expériences, et elle est appliquée sur des myotubes différenciés.

- Au 4^{ème} jour après l'induction de la différenciation des myotubes (cf. Fiche technique 7), remplacer le milieu de différenciation avec 3 ml de milieu frais

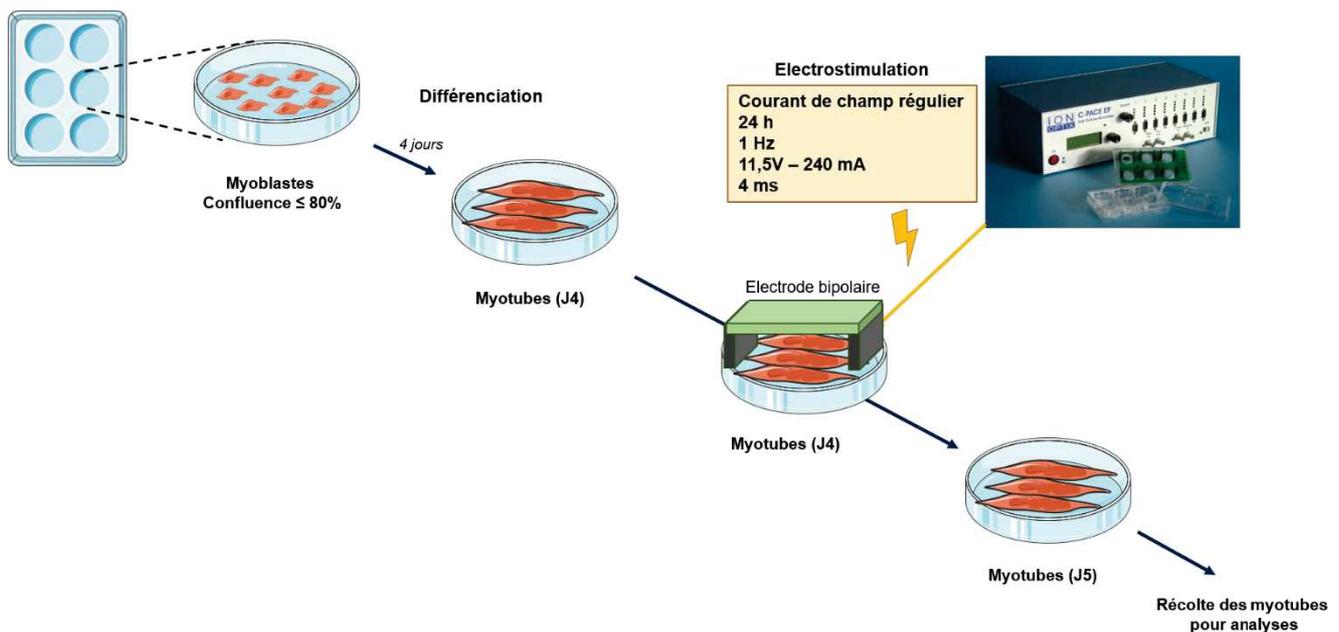
En parallèle ou au préalable, le couvercle d'électrostimulation doit être nettoyé pour éviter les contaminations :

- Nettoyer une première fois les électrodes de stimulations avec un papier absorbant humidifié avec de l'eau distillée, puis une seconde fois avec de l'éthanol 70%
- Sécher avec un papier absorbant
- Exposer les électrodes de stimulation aux lumière UV durant 15 min
- Une fois le milieu des cellules renouvelé et les électrodes nettoyées, placer le couvercle de stimulation de manière à ce que chaque doublet d'électrode baigne dans le milieu
- Placer dans l'incubateur et relier le couvercle de stimulation au générateur C-Pace EP
- Lancer le programme de stimulation

Pour les expérimentations relatives à la modélisation d'un REE, le programme choisi est un programme décrit dans la littérature comme « *endurance-like* » car il induit les adaptations métaboliques s'apparentant à un entraînement en endurance^{373,386} :

- Fréquence : 1 Hz
- Durée de pulsation : 4 ms
- Voltage : 11,5 V
- Durée du programme : 24h

Les protocoles d'immunofluorescence et d'extractions d'ARN_m et de protéines sont effectués à l'issue du programme.



Fiche technique 7 : Immunofluorescence des myotubes et analyses de la morphologie cellulaire

I. Principe :

Cette fiche technique regroupe l'ensemble des procédures permettant d'analyser le diamètre, l'index de fusion et la surface occupée par les myotubes grâce à l'imagerie par immunofluorescence.

Le diamètre des myotubes et la surface occupée par les myotubes sont des mesures complémentaires permettant d'évaluer l'épaisseur des myotubes, traduisant le niveau d'atrophie/hypertrophie des fibres formées. L'index de fusion permet quant à lui d'évaluer l'avancement de la différenciation des myotubes *in vitro* et peut aussi illustrer le recrutement de myoblastes suite à une électrostimulation.

II. Réactifs et solutions :

Réactifs	Fournisseur / Référence	Conservation / Ouverture
Phosphate Buffer Saline (PBS) 10X	EUROMEDEX / ET330-A	Température ambiante
Triton X100	Sigma / 9002-93-1	Température ambiante
Paraformaldéhyde (PFA) 32%	Electron Microscopy Sciences / 15714	Température ambiante / 4°C
Anticorps anti-Troponine T	Sigma / SAB4200717	-20°C
Solutions		
	Composition	
PBS 1X	Eau distillée / 10% PBS 10X	
Triton dilué	PBS 1X / 0,1% Triton X100	
PFA diluée	PBS 1X / PFA 3,2%	

III. Procédure :

L'imagerie par immunofluorescence est réalisée sur des myotubes à J5.

1. Préparation des cellules :

- Retirer le milieu de différenciation
- Laver délicatement avec du PBS 1X chauffé à 37°C
- Sous hotte à flux laminaire, fixer les cellules avec de la PFA 3,2%, durant 10 min
- Retirer la PFA et laver 3 fois avec du PBS 1X
- Incuber les myotubes avec la solution de Triton dilué, durant 5 min

- Retirer le Triton et laver délicatement 3 fois avec du PBS 1X
- Avec du papier absorbant, sécher le périmètre du fond de chaque puits de culture de manière à laisser un disque de cellules humide au centre de chaque puits. Cela permet de réduire les quantités d'anticorps nécessaires en concentrant les gouttes d'anticorps sur ce disque central de cellules.

2. Immunofluorescence :

- Incuber les myotubes avec 100 µl de solution d'anticorps primaire anti-Troponine T dilué au 1/200^e durant 1h30 dans une chambre humide placée dans un incubateur à 37°C
- Laver 3 fois avec du PBS
- Incuber les myotubes avec 100 µl d'anticorps secondaire Alexa Fluor 546 dilué au 1/1000^e et du Hoechst 1/2000^e durant 1h30 dans une chambre humide placée dans un incubateur à 37°C
- Laver 3 fois avec du PBS 1X
- Laver 1 fois avec de l'eau distillée
- Retirer l'eau distillée et laisser sécher sous hotte
- Ajouter une goutte de milieu de montage au centre du disque de cellules et recouvrir avec une lamelle de verre de manière à couvrir le disque de cellules
- Laisser sécher sur la nuit

3. Imagerie :

Les images des myotubes sont acquises avec un microscope à fluorescence Zeiss AxioImager M1, équipé d'une caméra AxioCam MRm CCD (CarlZeiss, Oberkochen, Allemagne) avec un objectif X5.

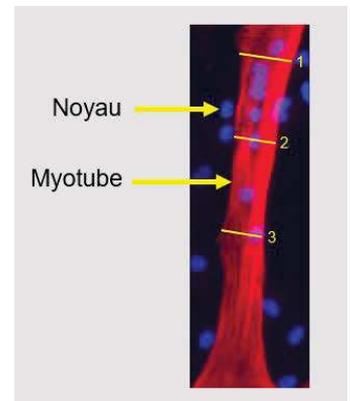
Après avoir fait la mise au point et régler l'exposition, 9 photos sont prises aléatoirement afin d'avoir une vision représentative de l'ensemble des myotubes de chaque culture.

IV. Analyses d'images :

Avant de passer aux mesures, les images suivent au préalable un traitement effectué avec le logiciel libre Fiji permettant d'accentuer les contrastes et les couleurs, afin de faciliter les mesures faites avec le même logiciel.

1. Diamètre des myotubes :

Les mesures de diamètre moyen ainsi que l'analyse de distribution sont obtenues sur des cellules positives au marquage Troponine T et comportant au moins 3 noyaux. Trois mesures du diamètre apparent sont effectuées le long d'un myotube (numéro en jaune sur le schéma à droite). 20 myotubes par image sont analysés, soit 180 myotubes analysés correspondant à 540 mesures de diamètre par sujet et condition.



2. Index de fusion et mesure de surface :

L'index de fusion (IdF) est une mesure consistant à évaluer l'avancement de la différenciation en mesurant le ratio de noyaux présents dans les myotubes (fusion) par rapport à l'ensemble des noyaux :

$$\frac{\text{nb noyaux dans les myotubes}}{\text{nb noyaux totaux}} = \text{IdF (\%)}$$

Cette mesure se base sur le principe qu'au moment de l'induction de la différenciation, l'IdF est nul puisque les myoblastes uninucléés sont disposés en monocouche. Au cours de la différenciation, les myoblastes fusionnent et forment des myotubes polynucléés, ce qui induit une augmentation de l'IdF.

La mesure de surface des myotubes est une mesure complémentaire au diamètre et consiste à évaluer sur un champ d'imagerie, la surface occupée par les myotubes. De la même manière que pour l'IdF, cette surface correspond au ratio de la surface de marquage des myotubes par rapport à la surface du champ total :

$$\frac{\text{surface de marquage Troponine T}}{\text{surface total du champ imagé}} = \text{surface occupée par les myotubes (\%)}$$

Etant donnée que l'IdF nécessite l'acquisition de la surface de marquage, l'IdF et la surface occupée par les myotubes sont obtenus au cours de la même procédure grâce à une macro conçue à cet effet pour le logiciel Fiji et permet un gain de temps sur les mesures tout en préservant la reproductibilité des résultats.

```

1
2 selectWindow(". (2).tif");
3 selectWindow(". (1).tif");
4
5
6 run("Color Balance...");
7 waitForUser;
8
9 run("Apply LUT");
10 run("Subtract Background...", "rolling=500 sliding disable");
11
12 setAutoThreshold("Huang dark no-reset");
13 run("Threshold...");
14 waitForUser;
15
16 setTool("rectangle");
17 makeRectangle(0, 0, 1380, 1037);
18 setForegroundColor(0, 0, 0);
19 run("Draw", "slice");
20 run("Select None");
21
22 run("Analyze Particles...", "size=0.003-Infinity display exclude add");
23 String.copyResults();
24 waitForUser;
25
26 run("Clear Results");
27 roiManager("Delete");
28 selectWindow(". (2).tif");
29
30 waitForUser;
31
32 run("Color Balance...");
33 run("Apply LUT");
34
35 run("Subtract Background...", "rolling=500 sliding disable");
36
37 setAutoThreshold("Huang dark no-reset");
38 run("Threshold...");
39
40 waitForUser;
41
42 run("Create Selection");
43 run("Measure");
44 String.copyResults();
45 waitForUser;
46
47 run("Clear Results");
48
49 run("Make Inverse");
50 run("Copy");
51 close();
52 selectWindow(". (1).tif");
53
54 run("Paste");
55 run("Select None");
56 setAutoThreshold("Huang dark no-reset");
57 run("Threshold...");
58 waitForUser;
59
60 run("Analyze Particles...", "size=0.003-Infinity display exclude add");
61 String.copyResults();
62 waitForUser;
63
64 roiManager("Delete");
65 run("Clear Results");
66
67 selectWindow(". (1).tif");
68 close();

```

- } Etape 1
- } Etape 2
- } Etape 3
- } Etape 4
- } Etape 5
- } Etape 6
- } Etape 7, 8 et 9
- } Etape 10
- } Etape 11
- } Etape 12

Description de la macro :

Renommer et Ouvrir les images relatives aux 2 canaux d'acquisition de la fluorescence : bleu (Hoechst) = noyaux ; rouge (Troponine T) = myotubes. Pour une gain de temps les images sont systématiques renommées : « . (1) » pour les noyaux et « . (2) » pour les myotubes.

Etape 1 (Lignes 2-3) : sélection simultanée des images 1 et 2.

Etape 2 (Lignes 6-7) : ouverture du menu d'équilibrage des couleurs et mise en pause de la macro. L'opérateur est invité à régler les balances de couleurs pour augmenter les contrastes. A noter que la fonction de mise en pause « *waitForUser* » est employée aux lignes 14, 24, 30, 40, 45, 58, 62 et nécessite la validation de l'opérateur pour continuer.

Ligne 9 : applique les nouveaux réglages de couleurs.

Etape 3 (Lignes 10) : applique un traitement d'image consistant à soustraire le bruit de fond surnuméraire lié à l'amplification des contrastes de couleurs. De cette manière les zones de surexposition sont lissées. Cette étape améliore la précision de la prise de mesure.

Etape 4 (Lignes 12 à 14) : ouvre le menu permettant d'appliquer un masque basé sur un seuil d'intensité d'exposition et met la macro en pause. L'opérateur doit régler le seuillage du masque (l'opérateur n'a généralement pas besoin de modifier les paramètres par défaut).

Etape 5 (Lignes 16 à 24) : ces deux étapes consistent d'abord à dessiner automatiquement un rectangle sur le périmètre de la photo (lignes 16-20) afin de séparer les noyaux touchant le bord de l'image que l'analyse par particules (lignes 22-24) ne mesure pas. Cette procédure consiste à mesurer toutes les particules ayant une circularité de 0 à 1 et une taille $\leq 0,003 \text{ inch}^2$, ce qui correspond à mesurer l'ensemble des noyaux présents sur l'image. Les résultats sont automatiquement copiés (ligne 23) et peuvent être directement collés dans un tableur.

Etape 6 (Lignes 26 à 28) : les résultats sont effacés de la mémoire et du menu de mesures, puis l'image « . (2) » (myotubes) est sélectionnée.

Etape 7, 8 et 9 (Lignes 32 à 38) : ces étapes sont identiques aux précédentes étape 2 à 4, mais appliquées aux myotubes.

Etape 10 (Lignes 42 à 45) : A l'image de l'analyse par particules à partir d'un masque seuillé effectuée à l'étape 5, l'outil de sélection permet de mesurer la surface occupée par les myotubes, la valeur de la surface étant automatiquement copiée et copiable dans un tableur. Puis, l'outil de sélection permet de définir un masque à partir du marquage des myotubes nécessaire à l'étape suivante.

Etape 11 (Lignes 47 à 57) : cette étape cruciale permet d'appliquer en « négatif » le masque de sélection, créé à l'étape 10, à l'image « . (1) » (noyaux), ce qui a pour effet d'effacer l'intégralité des noyaux ne faisant pas partie intégrante du marquage des myotubes.

Etape 12 (Ligne 60 à 62) : Cette dernière étape est une analyse de particules des noyaux présents dans les myotubes.

La fin de la macro est dédiée à la remise à zéro de la macro, pour préparer la prochaine exécution.

Fiche technique 8 : Extraction et purification des protéines et ARN totaux

I. Principe :

Le but de cette fiche technique est de décrire la procédure permettant d'extraire et d'isoler le contenu protéique et les ARN totaux à partir des myotubes au 5^{ème} jour de différenciation.

II. Réactifs et solutions :

Solutions / Tampon	Composition
Tampon de lyse (RA1)	30-60% Thiocyanate de Guanidine / 1% β -Mercaptoéthanol
Tampon d'inactivation (RA2)	30-60% Thiocyanate de Guanidine / 20-35% Ethanol
Tampon de lavage (RA3)	96-100% Ethanol
Tampon de désalinisation	1-15% Thiocyanate de Guanidine / 5-20%
Solution de précipitation	(non-communiquée par le fabricant)
Tampon de solubilisation des protéines (PSB-TCEP)	Tris(2-carboxyéthyl) phosphine hydrochloride 70-100% (Agent réducteur)

III. Procédure :

Les premières étapes d'extraction des protéines et des ARN totaux sont communes.

1. Extraction des protéiques et des ARN totaux :

- Retirer le milieu de différenciation
- Laver avec du PBS à 37°C
- Retirer le PBS, ajouter 350 μ l de tampon d'extraction
- Racler le fond de chaque boîte de culture avec un grattoir à cellule
- Récupérer l'homogénat dans un tube Eppendorf 1,5 ml et stocker à -80°C

Après au moins une nuit à -80°C, les homogénats congelés forment un précipité blanc qui est décongelé à température ambiante jusqu'à ce que chaque échantillon soit sous forme liquide et totalement translucide (sans précipité blanc).

2. Séparation des protéines et des ARN totaux :

- Une fois décongelé, filtrer le lysat sur une colonne violette et centrifuger à 11000 tours/min pendant 1 min. Cette étape permet de réduire la viscosité de l'échantillon
- Resuspendre délicatement les échantillons avec 350 μ L d'éthanol 70% (v/v).

- Filtrer l'homogénat sur une colonne bleue et centrifuger à 11000 tours/min pendant 1 min.

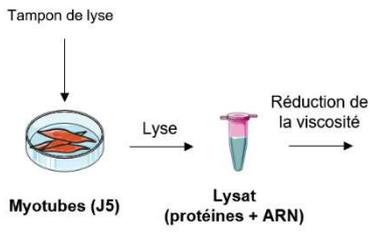
Cette étape permet de séparer les ARN totaux (retenus sur la colonne) et les protéines (récupérées dans un tube).

3. Purification des ARN totaux :

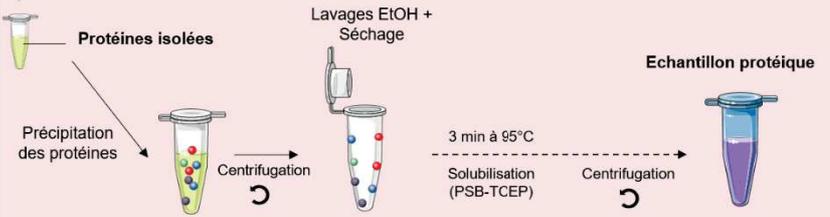
- Rééquilibrer les conditions minérales de la membrane et permettre une meilleure digestion des acides nucléiques par la rDNase en ajoutant 350 μ L de tampon de désalinisation
- Centrifuger 1 min à 11000 tours/min
- Digérer les acides nucléiques en ajoutant 100 μ L de rDNase 10%
- Laisser incubé 15 min à température ambiante
- Désactiver la rDNase en ajoutant 200 μ L de tampon d'inactivation, puis centrifuger 1 min à 11000 tours/min
- Effectuer un premier lavage de la colonne avec 600 μ L du tampon de lavage, suivi d'une centrifugation 1 min à 11000 tours/min
- Effectuer un second lavage de la colonne avec 200 μ L de tampon de lavage
- Centrifuger 2 min à 11000 tours/min et laisser sécher quelques minutes
- Eluer avec 40 à 60 μ L d'eau *RNase-free*, centrifuger 1 min à 11000 tours/min

4. Purification des protéines :

- Ajouter à chaque échantillon protéique 700 μ L de solution de précipitation (v/v), puis vortexer vigoureusement afin de rendre le mélange homogène. Incuber 10 min à température ambiante
- Centrifuger 5 min à 11000 tours/min
- Retirer le surnageant et laver avec 500 μ L d'éthanol 50%
- Centrifuger 1 min à 11000 tours/min
- Retirer l'éthanol délicatement (sans aspirer le culot protéique) et laisser sécher sur glace 10 à 30 min
- Ajouter 130 μ L de tampon de solubilisation des protéines (PSB-TCEP) et incubé 3 min à 95°C au bain marie sec
- Centrifuger 1 min à 11000 tours/min
- Transférer le surnageant dans un tube (culot = matériel insoluble).



Purification ARN



Purification protéines

Fiche technique 9 : RT-qPCR

I. Principe :

La Reverse Transcriptase-quantitative Polymerase Chain Reaction (RT-qPCR) est une technique qui permet de réaliser une PCR quantitative à partir d'un échantillon d'ARN. Dans le cas présent, l'ARN_m sert de modèle pour la synthèse d'ADN complémentaire (ADN_c) grâce à une enzyme de transcription inverse (*Reverse Transcriptase*) afin que celui-ci soit la matrice de la PCR quantitative. Le but étant de détecter/quantifier l'enrichissement de l'ARN_m d'un gène dans un échantillon traduisant ainsi son niveau d'expression, comparé à son expression dans un autre échantillon, relativement à l'expression d'un gène de référence.

II. Matériels et réactifs :

Réactifs	Fournisseur / Référence	Conservation / Ouverture
Transcriptor Universal cDNA Master - Tampon 4X - Transcriptase 1X	Roche / 5893151001	-20°C
Eau pour biologie moléculaire	Millipore / C100693	4°C
Amorces (<i>Primers</i>)	Eurofins	-20°C
SyBR Green I Master (2X) (+ Eau qPCR fournie)	Roche / 04 707 516 001	-20°C
Plaques 96 puits		Température ambiante
Matériels		
	Fournisseur	
MasterCycler	Eppendorf	
LightCycler 480	Roche	

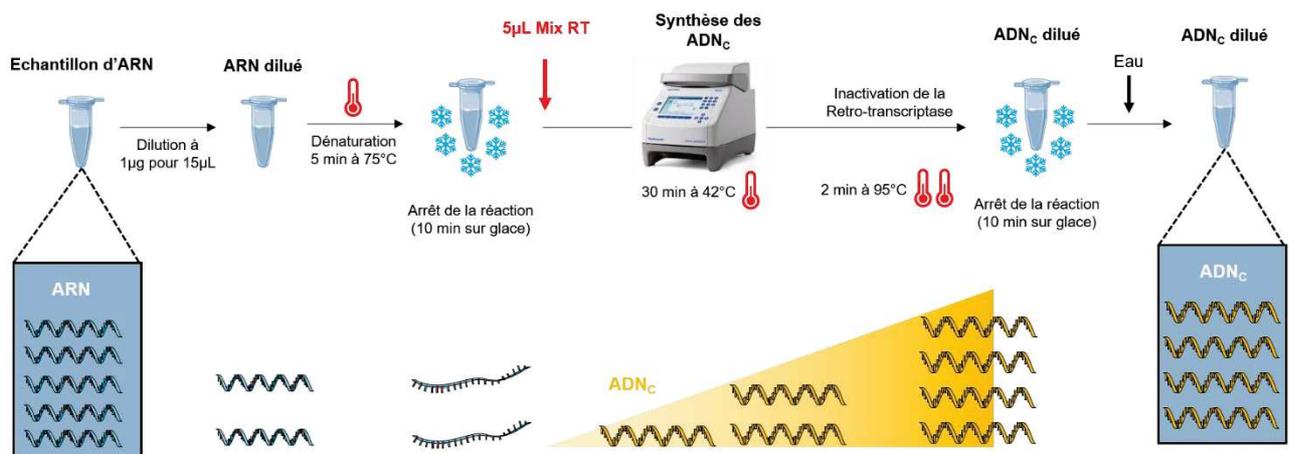
III. Procédures :

La première étape consiste à synthétiser les ADN_c.

- Dans une tube Eppendorf de 500 µL, préparer 15 µL d'échantillon d'ARN de sorte à obtenir 1µg d'ARN (diluer avec l'eau pour biologie moléculaire)
- Dénaturer les échantillons d'ARN durant 5 min à 75°C dans le MasterCycler (cette étape peut également être effectuer avec un bain marie sec préalablement mis à température)
- Figé la réaction en refroidissant rapidement les échantillons sur glace durant 10 min

- Ajouter à chaque échantillon 4 μL du tampon 4X et 1 μL de Transcriptase fournis dans le kit *Transcriptor*. Chaque échantillon doit maintenant contenir 20 μL de mélange réactionnel
- Synthèse des ADN_c dans le MasterCycler durant 30 min à 42°C
- Inactiver la Transcriptase en plaçant les échantillons à 95°C durant 2 min. Cette étape peut être effectuée par le MasterCycler à la suite du programme d'amplification ou avec un bain à sec préalablement mis à température.
- Figer la réaction en refroidissant rapidement les échantillons sur glace durant 10 min
- Centrifuger rapidement les échantillons (centrifugation de table)
- Diluer les échantillons avec de l'eau biomoléculaire : jusqu'à un volume de 250 μL /échantillon.
- Conserver les ADN_c à -20°C

Pour une RT à 1 μg d'ARN initial, la dilution finale est de 1/12,5. La RT peut également être faite avec 500 ng d'ARN initial, la dilution finale sera alors de 1/25.



La deuxième étape correspond à la préparation de la plaque de qPCR. L'ensemble des étapes se fait sur glace.

- Au préalable, les amorces sens et anti-sens spécifiques de chaque gène (voir liste ci-après) doivent être re-suspendues et diluées à 100 pmol/ μL (fournies sous forme lyophilisée par le fabricant, le volume d'eau à ajouter est précisé par le fournisseur)
- Les amorces re-suspendues sont ensuite diluées au 1/20 en ajoutant 10 μL de chaque amorce + 180 μL d'eau pour biologie moléculaire (volume total = 200 μL d'amorce à 5 μM)
- Décongeler les ADN_c, le SyBR Green et l'eau distillée sur glace.

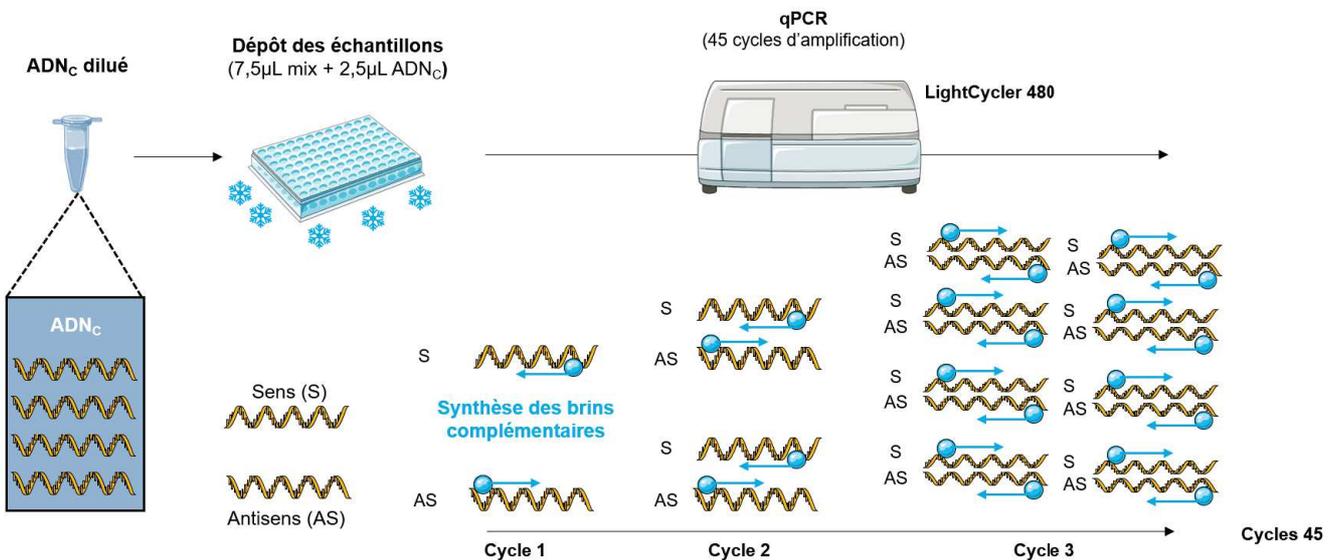
- Pour chaque gène à étudier, préparer un volume de mix réactionnel suffisant pour l'ensemble des échantillons, un contrôle inter-plaques (ADN_C calibrateur) et un contrôle négatif (eau sans ADN_C) en duplicat ou triplicat

Exemple : pour 10 échantillons et 2 contrôles en duplicat, le volume à préparer est :

- SyBR Green : 5 µL/puits → 5 µL x (10+2+1) x 2 = **130 µL**
 - Eau qPCR : 1,5 µL/puits → 1,5 µL x (10+2+1) x 2 = **39 µL**
 - Mix Amorces 5 µM : 1µL/puits → 1 µL x (10+2+1) x 2 = **26 µL**
- Dans une plaque 96 puits, déposer 7,5 µL de mix réactionnel + 2,5 µL d'ADN_C par puits, puis recouvrir la plaque d'un film transparent fourni avec le kit

La dernière étape correspond à la réaction de PCR effectuée par le LightCycler 480 selon le programme suivant :

- Pré-incubation : 15 min à 95°C
- 45 cycles d'amplification : 10 s à 95°C → 5 s à 60°C → 15 s à 72°C
- Courbe de fusion : 5 s à 95°C → 1 min à 65°C → chauffage progressif jusqu'à 97°C (+0,1°C/s)
- Refroidissement : 30 s à 40°C



Liste des amorces utilisées (Fournisseur : Eurofins) :

Gènes	Amorce Sens	Amorce Anti-sens
GAPDH	TTG CCA TCA ATG ACC CCT TC	GCA TCG CCC CAC TTG ATT TT
Atrogin1	CGA CCT CAG CAG TTA CTG CAA	TTT GCT ATC AGC TCC AAC AG
MuRF1	AAA CAG GAG TGC TCC AGT CGG	CGC CAC CAG CAT GGA GAT ACA
Nedd4	ACC ACA ACT TGG ACT CGA CC	GTC TTT CAC AGC CCG ACG TA
BNIP3L	CCA AGG AGT TCC ACT TCA GAC	AGT AGG TGC TGG CAG AGG GTG T
BNIP3	CTG AAA CAG ATA CCC ATA GCA TT	CCG ACT TGA CCA ATC CCA
SQSTM/p62	GCA CCT GTC TGA GGG CTT CT	GCT CCA GTT TCC TGG TGG AC
UVRAG	ACA AAA CCC CTC CTC CCA GT	CCT CCG TTT AAG CTG CCA AC
AMBRA1	ATG GGG AGG TTA GGA TTT GG	GCT GTC TTC ACC ACA GCA AA
GABARAPL1	GGT CCC CGT GAT TGT AGA GA	GGA GGG ATG GTG TTG TTG AC
Myostatine	GAG CAT TGA TGT GAA GAC AGT G	GTT ACC TTG ACC TCT AAA AAC GG
FoXO1	TTT GCG CCA CCA AAC ACC AGT T	TGG CTG CCA TAG GTT GAC ATG A
FoxO3	ACG TGA TGC TTC GCA ATG ATC CGA	ACT CAA GCC CAT GTT GCT GAC A
IGF1	TGA GCT GGT GGA TGC TGT TGA GTT	TGC ACT CCC TCT ACT TGC GTT CTT
mTOR	GGG GAC ACT TTT ACC GCT GA	AAT CAG ACA GGC ACG AAG GG
PGC1α	ACG CAC CGA AAT TCT CCC TT	TCT GTC CGT GTT GTG TCA GG
MyoD	ACA ACG GAC GAC TTC TAT GAC	TGC TCT TCG GGT TTC AGG A
Myf5	TGA TGG CAT GCC CGA ATG TA	CAG GTT GCT CTG AGG AGG TG
Myogénine	ACC CCG CTT CTA TGA TGG	ACA CCG ACT TCC TCT TAC ACA

Fiche technique 10 : SDS-PAGE et Western Blot

I. Principe :

L'électrophorèse sur gel d'acrylamide en conditions dénaturantes (SDS-PAGE) est une technique permettant, à partir d'un échantillon protéique, de séparer les protéines selon leur poids moléculaire indépendamment de leur charge nette en les faisant migrer dans un gel d'acrylamide.

Le *Western Blot* est une technique qui permet de rendre accessible les protéines en transférant les protéines du gel d'électrophorèse vers une membrane. En les rendant accessible, il est ainsi possible de les quantifier de manière semi-quantitative par une révélation immunologique. Le but est de quantifier l'enrichissement d'une protéine cible au sein d'un échantillon protéique vis-à-vis d'un autre échantillon.

II. Matériels et réactifs :

Réactifs	Fournisseur / Référence	Conservation / Ouverture
SDS	Sigma / L3771	Température ambiante
Ammonium Persulfate (APS)	Sigma / A3678	4°C
Tétraméthyléthylènediamine (TEMED)	Sigma / T7024	Température ambiante
30% Acrylamide/Bisacrylamide (37.5/1)	Euromedex / EU0088-B	4°C
Trizma® Base	Sigma / T1503	Température ambiante
Tampon de blocage Odyssey®	LI-COR / 927-40000	4°C
Solutions	Composition	
SDS 10%	H ₂ O / 10% SDS	
Tris 1,5M (pH=8,8)	H ₂ O / Trizma Base	
Tris 1M (pH=6,8)		
Gel de migration	H ₂ O / 30% Acrylamide / Tris 1,5M / 10% SDS / TEMED	
Gel de concentration	H ₂ O / 30% Acrylamide / Tris 1M / 10% SDS / TEMED	
Tampon de migration	Tris-Glycine 1X	
Tampon de transfert	Tris-Glycine SDS 1X	
PBS / Tween 20	PBS 1X / 0,1% Tween 20	
Matériels	Fournisseur	
Cuve à électrophorèse	BIO-RAD	
Générateur PowerPAC		
Plaques de verre		
Peignes (15 puits)		
Marqueur de poids moléculaire	BIO-RAD (Precision Plus Protein Standards Blue)	

III. Procédure :

1. SDS-PAGE :

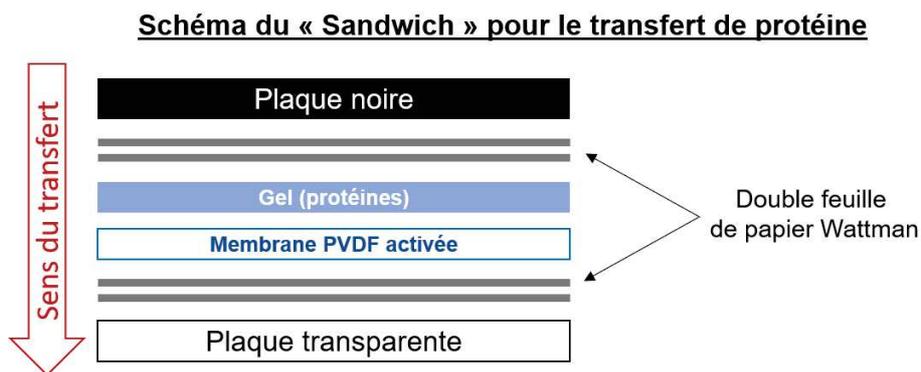
La première étape du SDS-PAGE consiste à préparer les gels de migration et de concentration.

- Dans un tube Falcon, préparer la solution du gel de migration (voir composition ci-dessus) sans ajouter l'APS ni le TEMED
- Mettre en place le montage des plaques de verre avec l'échafaudage, en vérifiant avec de l'eau que le montage ne souffre d'aucune fuite
- Retirer l'eau des plaques de verre
- Ajouter l'APS et le TEMED dans la solution du gel de migration, agiter et couler le gel dans le montage de plaques de verre
- S'assurer qu'aucune bulle ne persiste sur le front supérieur du gel de migration en ajoutant délicatement quelques gouttes d'eau
- Laisser polymériser durant 30 min à l'incubateur 37°C
- Pendant la polymérisation du gel de migration, préparer le gel de concentration (voir composition ci-dessus) sans ajouter l'APS ni le TEMED
- Une fois le gel de migration polymérisé, retirer l'eau sur le front supérieur du gel
- Ajouter l'APS et le TEMED dans la solution du gel de concentration, agiter et couler le gel dans le montage, sur le gel de migration
- Positionner rapidement un peigne dans le gel de concentration en faisant attention de ne pas former de bulle
- Laisser polymériser durant 30 min à l'incubateur 37°C
- Pendant la polymérisation, laisser décongeler les échantillons protéiques sur glace ainsi que le marqueur de poids moléculaire
- Une fois polymérisé placer les plaques dans une cuve à électrophorèse
- Remplir les cuves basse et haute de tampon de migration de sorte que les gels soient complètement immergés
- Retirer le(s) peignes
- Déposer dans les puits le marqueur de poids moléculaire et les échantillons protéiques
- Après avoir régler le générateur sur 100V, positionner le couvercle reliant le générateur et la cuve. Lancer la migration pour 40 à 45 min

2. Western Blot :

Après avoir fait migrer les protéines dans le gel d'électrophorèse, il est maintenant nécessaire de transférer les protéines depuis le gel vers une membrane de PVDF (PolyVinylidène Fluoride), préalablement activée avec de l'éthanol 100%, ou une membrane de nitrocellulose.

- Après avoir éteint le générateur, récupérer les gels contenant les protéines
- Dans un bac contenant du tampon de transfert, placer le gel en contact intégral avec la membrane de PVDF activée (sans bulle), le tout entouré de part et d'autre de 4 feuilles de papier Wattman (2 de chaque côté du gel et de la membrane)
- Placer le « sandwich » dans une cassette de transfert (plaque noire/blanche sur le schéma), elle-même dans une cuve remplie de tampon de transfert
- Après avoir régler le générateur sur 200V, positionner le couvercle reliant le générateur et la cuve. Lancer le transfert pour 1h30.

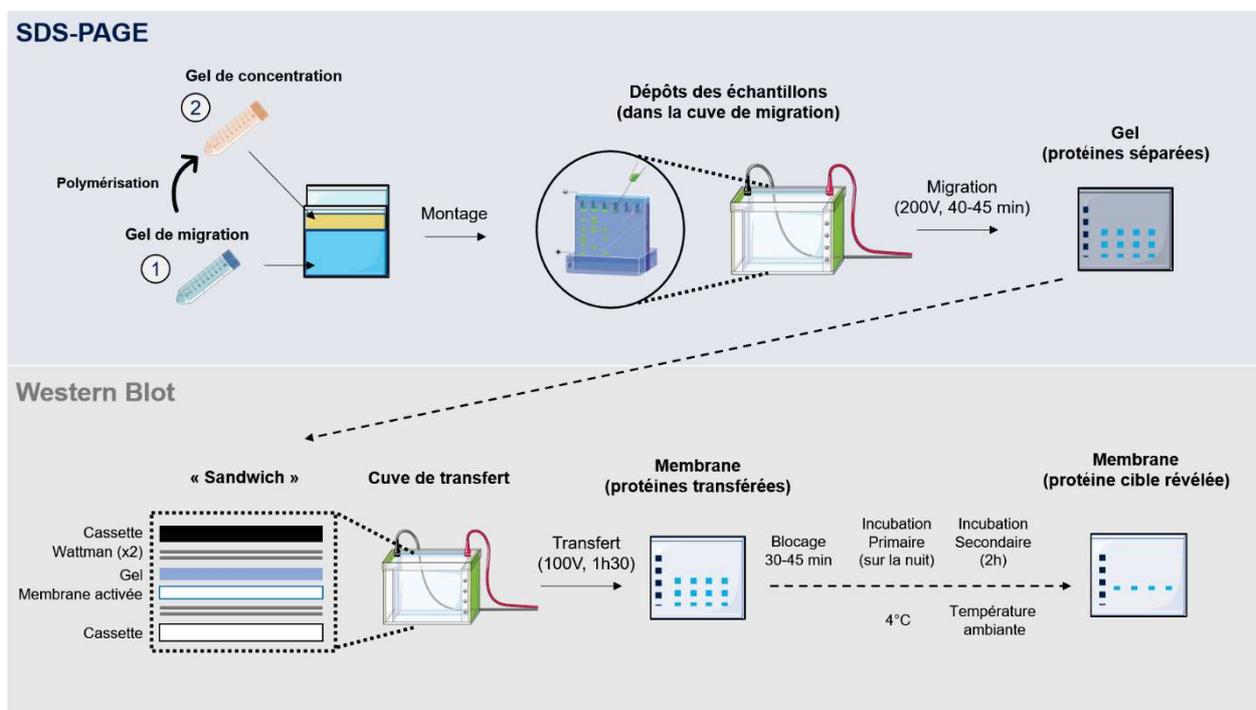


3. Révélation par immunohistochimie :

Une fois le transfert terminé :

- Retirer la membrane contenant les protéines transférées et le marqueur de poids moléculaires (visible). Laver rapidement avec du PBS/Tween 20
- Bloquer la membrane avec 4 ml de solution de blocage Odyssey pendant 30-45 min
- Ajouter l'anticorps primaire de la protéine cible directement dans la solution de blocage (voir liste des anticorps et dilutions ci-après)
- Laisser incuber sous agitation à 4°C toute la nuit
- Récupérer la solution d'anticorps primaire (réutilisable plusieurs fois selon les anticorps)
- Laver 3 fois avec du PBS / Tween 20
- Incuber la membrane dans une solution d'anticorps secondaire pendant 2h (voir liste des anticorps et dilutions ci-après)

- Laver 3 fois avec du PBS / Tween 20, puis 1 fois avec du PBS.
- Laisser sécher la membrane à l'abri de la lumière
- La révélation est effectuée avec un appareil Odyssey (LI-COR, Nebraska, USA)



Liste des anticorps primaires et dilutions :

Gènes	Dilution	Clone	Fournisseur / Référence
pAkt	1/1000	Lapin	Cell Signaling / D9E
Akt	1/1000	Lapin	Cell Signaling / 9272S
pNFκB	1/1000	Lapin	Cell signaling / 93H1
NFκB	1/1000	Lapin	Cell Signaling / D14E12
MHC1	1/5000	Souris	Sigma / M8421
4HNE	1/400	Mouton	Millipore / AB5605
αTubuline	1/5000	Souris	Santa Cruz / sc-32293

Liste des anticorps secondaires et dilutions :

	Dilution	Clone	Fournisseur
Anti-souris (rouge)	1/30000	Mouton anti-souris	LICOR / IRDye680RD
Anti-lapin (vert)	1/30000	Mouton-anti-lapin	LICOR / IRDye800CW
Anti-mouton (vert)	1/30000	Âne anti-mouton	LICOR / IRDye800CW
Hoechst 33258	1/2000	-	Sigma / 861405
Alexa Fluor 546	1/1000	Mouton anti-souris	Life Technologies / A11018

Résultats des études

Etude 1: Oxidative stress regulates autophagy in cultured muscle cells of patients with chronic obstructive pulmonary disease

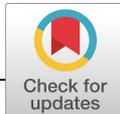
Farès Gouzi^{1,2}, Marine Blaquièrè^{1,2}, **Matthias Catteau**¹, François Bughin^{1,2}, Jonathan Maury^{1,3}, Emilie Passerieux¹, Bronia Ayoub^{1,2}, Jacques Mercier^{1,2}, Maurice Hayot^{1,2}, Pascal Pomiès^{1*}

¹PhyMedExp, University of Montpellier, INSERM, CNRS, Montpellier, France

²Department of Clinical Physiology, CHRU of Montpellier, Montpellier, France

³Clinique du Souffle « La Solane », Fontalvie/5-Santé Group, Osséja, France

Dans cette première étude du manuscrit, je me suis impliqué à plusieurs niveaux dans l'accomplissement de ce travail. Outre les analyses d'expression de gènes par RT-qPCR et les quantifications par *Western Blot* relatives aux cultures primaires traitées avec du 3-MA, j'ai participé à l'élaboration des éléments de la discussion ainsi qu'aux relectures des différentes versions du manuscrit qui ont abouti à cette publication.



Oxidative stress regulates autophagy in cultured muscle cells of patients with chronic obstructive pulmonary disease

Fares Gouzi^{1,2} | Marine Blaqui re^{1,2} | Matthias Catteau¹ | François Bughin^{1,2} | Jonathan Maury^{1,3} | Emilie Passerieux¹ | Bronia Ayoub^{1,2} | Jacques Mercier^{1,2} | Maurice Hayot^{1,2*} | Pascal Pomi s^{1*}

¹PhyMedExp, University of Montpellier, INSERM, CNRS, Montpellier, France

²Department of Clinical Physiology, CHRU of Montpellier, Montpellier, France

³Clinique du Souffle "La Solane," Fontalvie/5-Santé Group, Osséja, France

Correspondence

Pascal Pomiès, PhyMedExp, 371 Avenue du Doyen Giraud, CHRU Arnaud de Villeneuve, 34295 Montpellier Cedex 5, France.
Email: pascal.pomies@inserm.fr

Funding information

CHRU of Montpellier, PHRC (AREB-1); Aparid (Association Pour l'Assistance et la Réhabilitation   Domicile)

The proteolytic autophagy pathway is enhanced in the lower limb muscles of patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD). Reactive oxygen species (ROS) have been shown to regulate autophagy in the skeletal muscles, but the role of oxidative stress in the muscle autophagy of patients with COPD is unknown. We used cultured myoblasts and myotubes from the quadriceps of eight healthy subjects and twelve patients with COPD (FEV1% predicted: 102.0% and 32.0%, respectively; $p < 0.0001$). We compared the autophagosome formation, the expression of autophagy markers, and the autophagic flux in healthy subjects and the patients with COPD, and we evaluated the effects of the 3-methyladenine (3-MA) autophagy inhibitor on the atrophy of COPD myotubes. Autophagy was also assessed in COPD myotubes treated with an antioxidant molecule, ascorbic acid. Autophagosome formation was increased in COPD myoblasts and myotubes ($p = 0.011$; $p < 0.001$), and the LC3 2/LC3 1 ratio ($p = 0.002$), SQSTM1 mRNA and protein expression ($p = 0.023$; $p = 0.007$), BNIP3 expression ($p = 0.031$), and autophagic flux ($p = 0.002$) were higher in COPD myoblasts. Inhibition of autophagy with 3-MA increased the COPD myotube diameter ($p < 0.001$) to a level similar to the diameter of healthy subject myotubes. Treatment of COPD myotubes with ascorbic acid decreased ROS concentration ($p < 0.001$), ROS-induced protein carbonylation ($p = 0.019$), the LC3 2/LC3 1 ratio ($p = 0.037$), the expression of SQSTM1 ($p < 0.001$) and BNIP3 ($p < 0.001$), and increased the COPD myotube diameter ($p < 0.001$). Thus, autophagy signaling is enhanced in cultured COPD muscle cells. Furthermore, the oxidative stress level contributes to the regulation of autophagy, which is involved in the atrophy of COPD myotubes in vitro.

KEYWORDS

atrophy, autophagy, chronic obstructive pulmonary disease (COPD), oxidative stress, satellite cells

1 | INTRODUCTION

Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is characterized by airflow obstruction resulting from the inflammatory response of the lungs to inhaled toxic particles. Among the comorbidities associated

*Hayot and Pomiès contributed equally to this study.

with COPD, muscle dysfunction has a crucial impact on the quality of life and mortality rate of patients. Muscle dysfunction is associated with reduced muscle strength and endurance and is often accompanied by muscle atrophy of the lower limbs, which has been attributed in great part to increased protein degradation due to activation of the ubiquitin/proteasome pathway (Doucet et al., 2007; Plant et al., 2010).

The autophagy-lysosome pathway is a proteolytic system that contributes to muscle homeostasis through the elimination of protein aggregates and damaged organelles. Autophagy has been shown to be induced in skeletal muscles in response to various pro-atrophic stimuli such as starvation (Mizushima, Yamamoto, Matsui, Yoshimori, & Ohsumi, 2004), denervation-induced muscle disuse (O'Leary, Vainshtein, Carter, Zhang, & Hood, 2012), hypoxia (Bellot et al., 2009), and oxidative stress (Dobrowolny et al., 2008). Furthermore, use of the antioxidant molecule N-acetylcysteine (NAC) has shown that reactive oxygen species (ROS) regulate autophagy in *in vitro* myogenic C2C12 cells, as well as in the skeletal muscles of mice (Qi, He, Ji, & Ding, 2014; Rahman et al., 2014). In COPD, autophagy signaling is enhanced in the tibialis anterior and vastus lateralis of stable patients (Guo et al., 2013; Puig-Vilanova et al., 2015). Moreover, indirect measurements suggest that oxidative stress might contribute to autophagy, and autophagy markers are inversely correlated with thigh atrophy and lung function impairment in patients with COPD (Guo et al., 2013). Nevertheless, while ROS have been shown to regulate autophagy in skeletal muscles, the involvement of oxidative stress in COPD muscle autophagy has yet to be clearly demonstrated.

We recently developed a cellular model based on purified satellite cells derived from the quadriceps of patients with COPD and showed that oxidative stress is involved in the atrophy of cultured COPD myotubes via the ubiquitin/proteasome signaling pathway (Pomiès et al., 2015, 2016). Here, we use this cellular model to assess the role of autophagy in the atrophy of COPD muscle cells *in vitro* and to investigate whether oxidative stress is involved in COPD muscle autophagy. Autophagy signaling was evaluated with various autophagy markers in *in vitro* muscle cells of patients with COPD and healthy subjects, while the effect of the autophagy inhibitor 3-methyladenine (3-MA) was tested on COPD myotube atrophy. Autophagy signaling was also assessed in cultured COPD myotubes subjected to antioxidant treatment.

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | Study population

The two study groups, sedentary healthy subjects ($n = 8$) and patients with COPD ($n = 12$), are identical to the groups we have previously studied (Pomiès et al., 2016), and their characteristics are detailed in Table 1. Anthropometry, pulmonary function, exercise level and peripheral muscle function were assessed, as previously described (Pomiès et al., 2016). All subjects gave an informed written consent, and the research protocol was approved by the institutional ethics

TABLE 1 Characteristics of the study groups

	Healthy subjects	COPD patients	P-value
<i>n</i>	8	12	-
Gender (M/F)	7/1	9/3	-
Age (year)	62.0 [57.0–67.5]	59.0 [54.0–62.8]	0.393
BMI (kg/m ²)	25.9 [24.3–27.8]	21.6 [19.0–26.0]	0.071
FFMI (kg/m ²)	19.4 [18.4–20.5]	17.1 [15.0–18.3]	0.025
FEV1 (% pred.)	102.0 [93.0–105.0]	32.0 [26.8–47.5]	<0.0001
FEV1/FVC (%)	75.0 [68.8–81.5]	39.0 [32.0–41.0]	0.002
6MWD (% pred.)	88.0 [83.5–97.0]	68.0 [55.5–71.5]	<0.0001
qMVC (kg)	27.7 [25.1–31.6]	17.6 [12.9–32.2]	0.071
BODE index	-	5.0 [4.3–8.5]	-

Note. BMI, body mass index; COPD, chronic obstructive pulmonary disease; FFMI, fat-free mass index; FEV1, forced expiratory volume in 1 s; FVC, forced vital capacity; 6MWD, 6-min walking distance; qMVC, quadriceps muscle voluntary contraction.

The BODE index takes into account the body mass index, the airflow obstruction, the functional dyspnea, and the exercise capacity (Celli et al., 2004). Values are presented as median [25th percentile–75th percentile].

committee of the Montpellier University Hospitals (no. 2009-04-BPCO-V2 and no. 2011-A00842-39) and conducted in accordance with the Helsinki Declaration and the European guidelines for “good clinical practice.”

2.2 | Muscle biopsy, myoblast purification, and cell culture

Muscle biopsies were obtained from the vastus lateralis using our needle method (Gouzi et al., 2013). One piece of the biopsy was flash frozen in a liquid nitrogen precooled beaker of isopentane and then conserved at -80°C , until total RNA extraction using the NucleoSpin RNA/protein purification kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany). Another piece of the biopsy was progressively frozen for later satellite cell purification, as described previously (Pomiès et al., 2015). Myoblast purification was performed using an immunomagnetic method, as previously described in detail (Pomiès et al., 2015).

The myoblasts were grown in collagen-coated petri dishes in proliferation medium: Dulbecco modified Eagle medium (DMEM)/20% fetal bovine serum (FBS)/0.5% Ultrosor. Myoblasts were always cultured at a passage below P4. Differentiation was induced by replacing the proliferation medium with the differentiation medium: DMEM/2% FBS. Myotubes were obtained after 5 days in differentiation medium.

2.3 | Cell treatments

Healthy and COPD myoblasts and myotubes were grown in the presence of 200 nM bafilomycin A1 or phosphate-buffered saline (PBS) for 90 min before harvesting the cells. The LC3 2 autophagic flux was determined by calculating the difference between the LC3 2/tubulin ratio in the presence and in the absence of bafilomycin A1.

TABLE 2 Primers used

Gene	Forward primer	Reverse primer	Product length
SQSTM1	GCACCTGTCTGAGGGCTTCT	GCTCCAGTTTCTGGTGGAC	103
BNIP3	CTGAAACAGATACCCATAGCATT	CCGACTTGACCAATCCCA	131
GABARAPL1	GGTCCCCGTGATTGTAGAGA	GGAGGGATGGTGTGTTGAC	174

The autophagy inhibitor 3-MA was added to myotubes after 4 days of differentiation at a concentration of 500 μ M for 18 hr. These conditions were chosen because they can induce a significant decrease in autophagy marker expression associated with an increase in the COPD myotube diameter, while higher 3-MA concentrations do not improve these effects (data not shown).

Ascorbic acid was added at a concentration of 0.14 mM to the culture medium of myoblasts, 1 day before induction of

differentiation. Ascorbic acid was then renewed every day until the end of the differentiation, as previously described (Pomiès et al., 2016).

2.4 | Fluorescence microscopy and image analysis

Myoblasts or myotubes were fixed for 15 min in PBS/3.7% formaldehyde, permeabilized in PBS/0.1% Triton X-100 for 5 min,

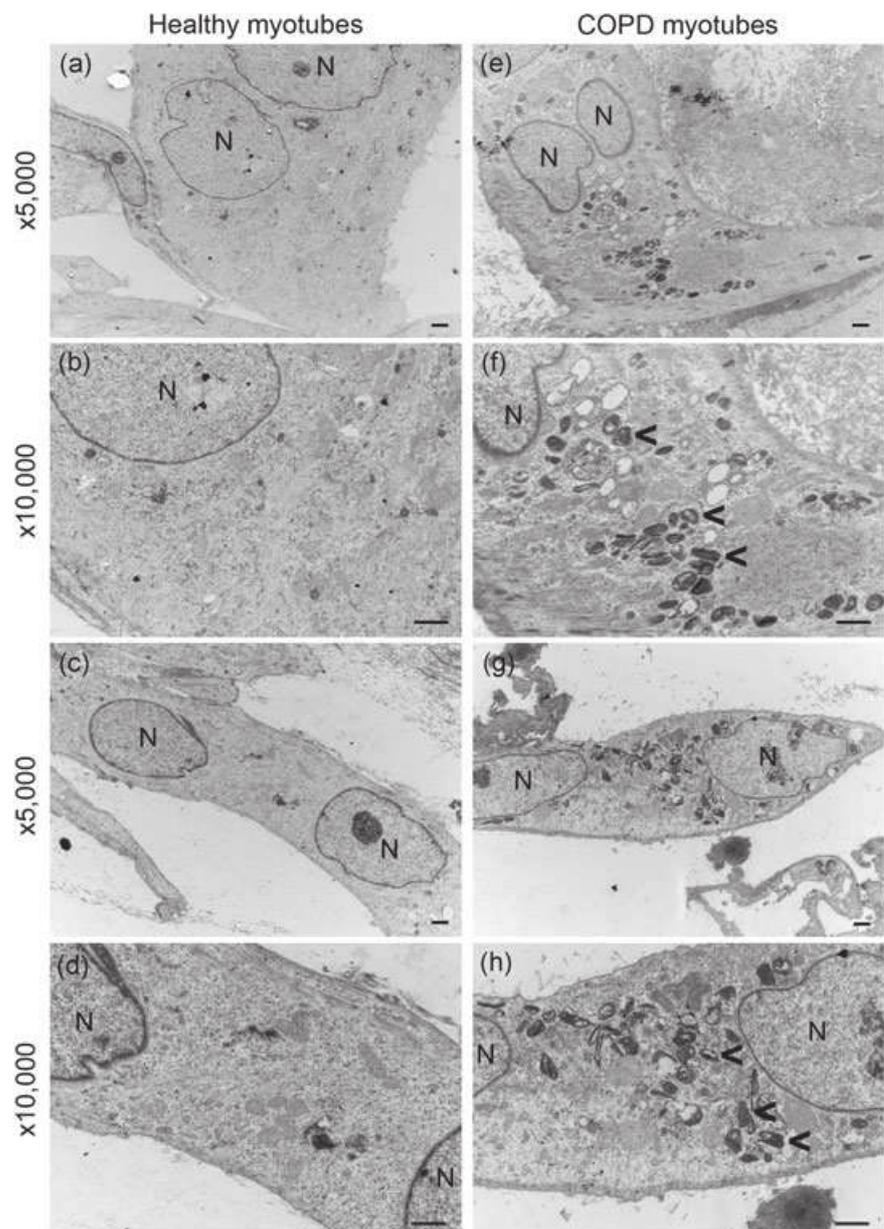


FIGURE 1 Autophagosomes in healthy and COPD myotubes. Representative electron micrographs of healthy subject myotubes (a–d) and COPD patient myotubes (e–h). b, d, f and h are blow-up images ($\times 10,000$) of a, c, e and g images ($\times 5,000$), respectively. Arrows point towards autophagosomes, while N indicates a nucleus. Bar = 1 μ m

and then stained for 1 hr at 37°C with an anti-LC3 antibody and Hoechst 33258. Images were taken in five random fields using an AxioCam MRm CCD camera (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) on an AxioImager M1 microscope (Carl Zeiss) at 10× magnification. Images were anonymized and the LC3 staining density for each image was analyzed using ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD), as previously described (Zhang et al., 2014). For assessment of the myotube diameter, myotubes were first stained with an anti-troponin T antibody and Hoechst 33258. Images were captured in five random fields at 5× magnification and anonymized. The diameter was then assessed by measuring three diameters along each myotube, for 100 myotubes per condition.

2.5 | Electron microscopy

Myotubes were immersed in a solution of 2.5% glutaraldehyde in PHEM (PIPES, HEPES, EGTA and $MgCl_2$) buffer pH 7.4 overnight at 4°C. They were then rinsed in PHEM buffer and fixed in 0.5% osmic acid for 2 hr in the dark at room temperature. After two rinses in PHEM buffer, the cells were dehydrated in a graded series of ethanol solutions 30%–100%. The cells were then embedded in EMBED 812 (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA) using an EM AMW automatic microwave tissue processor (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany). Thin sections of 70 nm were collected with an Ultracut E microtome (Leica) at different levels of each block. These sections were counterstained with 1.5% uranyl acetate in 70% ethanol and lead citrate and observed using a H7100 transmission electron microscope (Hitachi, Tokyo, Japan).

2.6 | SDS-PAGE and immunoblotting

Proteins were extracted from myoblasts and myotubes with hypotonic buffer: 20 mM Tris pH 7.5/10 mM NaCl/1 mM DTT/protease inhibitor cocktail, separated by SDS-PAGE and transferred to Immobilon-P PVDF membranes (Millipore, Bedford, MA). LC3 1 and LC3 2 were detected with a specific anti-LC3A/B antibody. The membranes were analyzed on an Odyssey imaging system (LI-COR Biotechnology, Lincoln, NE).

2.7 | Quantitative polymerase chain reaction

Total RNA extraction from cultured cells, first strand complementary DNA synthesis, and quantitative polymerase chain reaction protocol and analysis have been described (Pomiès et al., 2016). Specific values were normalized to the values of the housekeeping gene GAPDH. The primer sequences are shown in Table 2.

2.8 | Reagents and antibodies

Mouse monoclonal anti-troponin T was purchased from Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO), and rabbit polyclonal anti-LC3A/B and rabbit monoclonal anti-SQSTM1/p62 from Cell Signaling Technology

(Danvers, MA). Hoechst 33258, 3-MA, bafilomycin A1 and ascorbic acid were purchased from Sigma-Aldrich.

2.9 | Statistical analysis

The variables of the healthy control and COPD patient groups were compared with the Student t-test. The percentage of variation between the “with” and “without” treatment was compared with a reference value of 100 using the Student t-test. Spearman's coefficient was used to assess correlations between variables. The variations in the myotube diameter of the study groups “with” or “without” 3-MA treatment were compared using the Wilcoxon signed rank test. Statistical analysis was performed using GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, San Diego, CA).

3 | RESULTS

3.1 | Characteristics of the study groups

Table 1 illustrates the main clinical and functional characteristics of the healthy subjects ($n = 8$) and patients with COPD ($n = 12$). The following values reflected the moderate to severe clinical state of the COPD group: forced expiratory volume in 1 s (FEV1) lower than 50% predicted, moderately reduced 6-min walking distance (6MWD) and quadriceps muscle voluntary contraction (qMVC) values, and a relatively high BODE index (Celli et al., 2004).

3.2 | Elevated autophagy signaling in COPD myoblasts and myotubes

To evaluate the autophagosome formation level in the cultured COPD myotubes, autophagosomes were detected using transmission electron microscopy. Representative images of myotube cultures from two healthy subjects and two patients with COPD showed the abundance of autophagosomes in COPD myotubes compared with control myotubes (Figure 1). To quantify autophagosome formation, the expression level of the autophagosome marker, LC3, was assessed using immunofluorescence microscopy in myoblasts and myotubes derived from a limited number of patients with COPD and healthy subjects from our study groups. Representative images of one control and one COPD myoblast culture, as well as one control and one COPD myotube culture, are presented in Figure 2a,b,d,e, respectively. Figure 2b,e showed typical dot-like staining of autophagosomes in COPD myoblasts and myotubes, respectively. Analysis of the LC3 expression level showed significantly increased autophagosome formation in COPD myoblasts ($p = 0.011$; Figure 2c) and COPD myotubes ($p < 0.001$; Figure 2f) compared with healthy subject cells.

To confirm the elevated autophagy signaling in COPD myoblasts and myotubes, several autophagy-related markers were assessed. The LC3 2/LC3 1 ratio was significantly higher in COPD myoblasts compared with muscle cells from healthy subjects

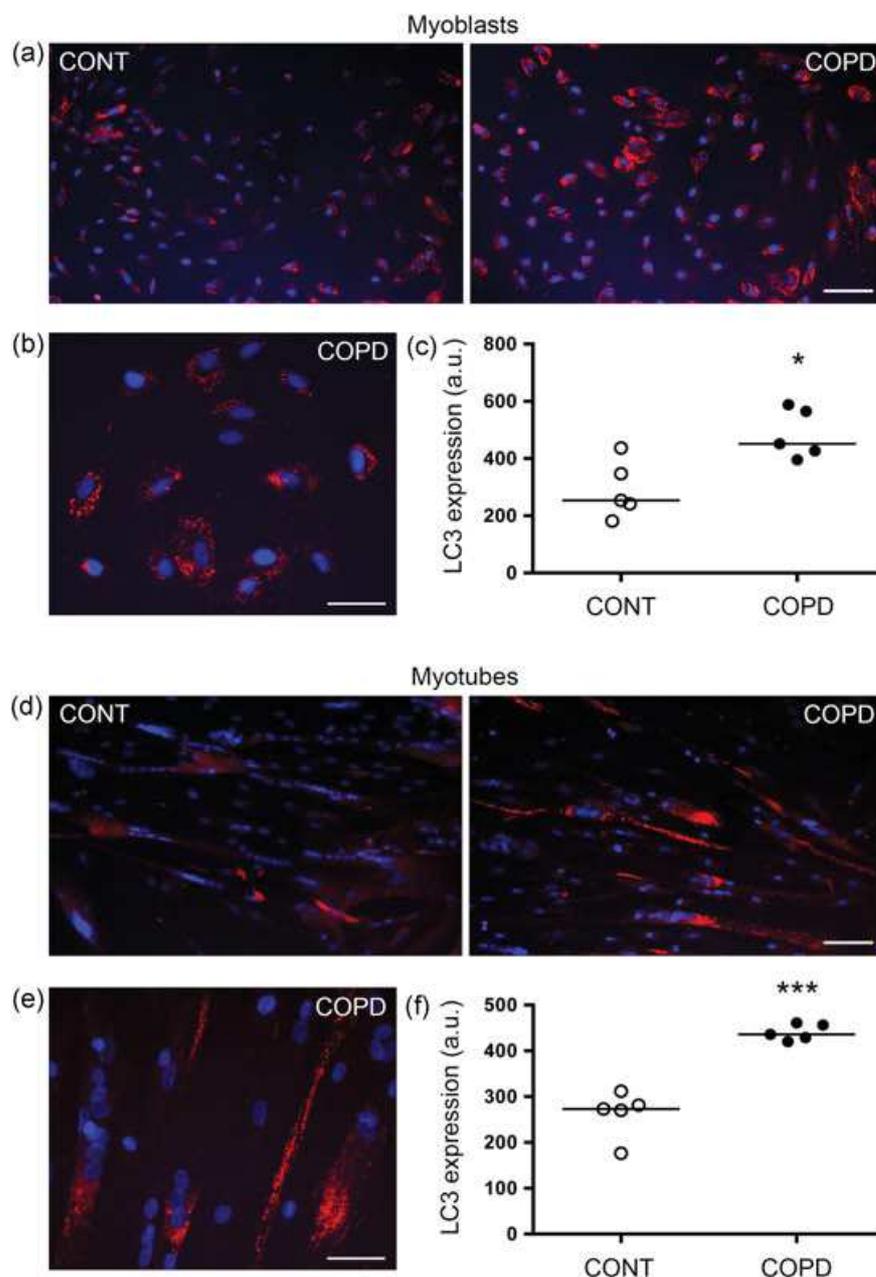
($p = 0.002$; Figure 3a). In addition, SQSTM1 mRNA and protein as well as BNIP3 mRNA expression in COPD myoblasts (Figure 3b,c) was significantly more elevated than in myoblasts from healthy subjects ($p = 0.023$, $p = 0.007$, $p = 0.031$, respectively). No significant difference in GABARAPL1 expression was detected in the COPD muscle cells (Figure 3d).

To determine whether the enhanced expression of the autophagic markers in COPD myoblasts was due to an enhanced induction of autophagy or a reduced autophagic degradation, the autophagic flux was assessed using the lysosomal inhibitor bafilomycin A1. The LC3 2 autophagic flux was significantly more elevated in COPD myoblasts than in healthy myoblasts ($p = 0.002$; Figure 4a), whereas no difference was observed between COPD and healthy myotubes (Figure 4b).

To assess the link between the enhanced autophagy signaling we observed in vitro and the increased autophagy described in the

lower limb muscles of patients with COPD by others (Guo et al., 2013; Puig-Vilanova et al., 2015), we determined the expression of the autophagy marker BNIP3 in quadriceps biopsies obtained from five healthy subjects and six patients with COPD of our study groups. Although the BNIP3 expression in the patients with COPD was not significantly higher than that in the healthy subjects ($p = 0.219$; Figure 5a), BNIP3 expression in quadriceps biopsies was positively correlated with the BNIP3 expression in the cultured myoblasts ($r = 0.663$; $p = 0.031$; Figure 5b). Interestingly, the BNIP3 expression in muscle biopsies was inversely correlated with both FEV1 (% predicted) ($r = -0.645$; $p = 0.037$; Figure 5c) and 6MWD (% predicted) ($r = -0.736$; $p = 0.013$; Figure 5d) of the study subjects. A statistical significance at $p < 0.05$ is still observed for the three presented correlations when the outer COPD value is removed.

FIGURE 2 LC3 expression levels in healthy and COPD myoblasts and myotubes. (a) Representative images of control healthy subject (CONT) and COPD (COPD) myoblasts, showing fluorescence double-labeling using an anti-LC3 antibody (red) and Hoechst (blue). Bar = 200 μm . (b) Higher magnification showing dot-like staining of autophagosomes in COPD myoblasts. Bar = 50 μm . (c) Densitometric analysis of the LC3 staining (arbitrary unit) in myoblasts from five healthy subjects and five patients with COPD. (d) Representative images of control healthy subject (CONT) and COPD (COPD) myotubes, showing fluorescence double-labeling using an anti-LC3 antibody (red) and Hoechst (blue). Bar = 200 μm . (e) Higher magnification showing dot-like staining of autophagosomes in COPD myotubes. Bar = 50 μm . (f) Densitometric analysis of the LC3 staining (arbitrary unit) in myotubes from five healthy subjects and five patients with COPD. (*) and (***) indicate statistical significance at $p < 0.05$ and $p < 0.001$, respectively. The medians are indicated. COPD, chronic obstructive pulmonary disease [Color figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]



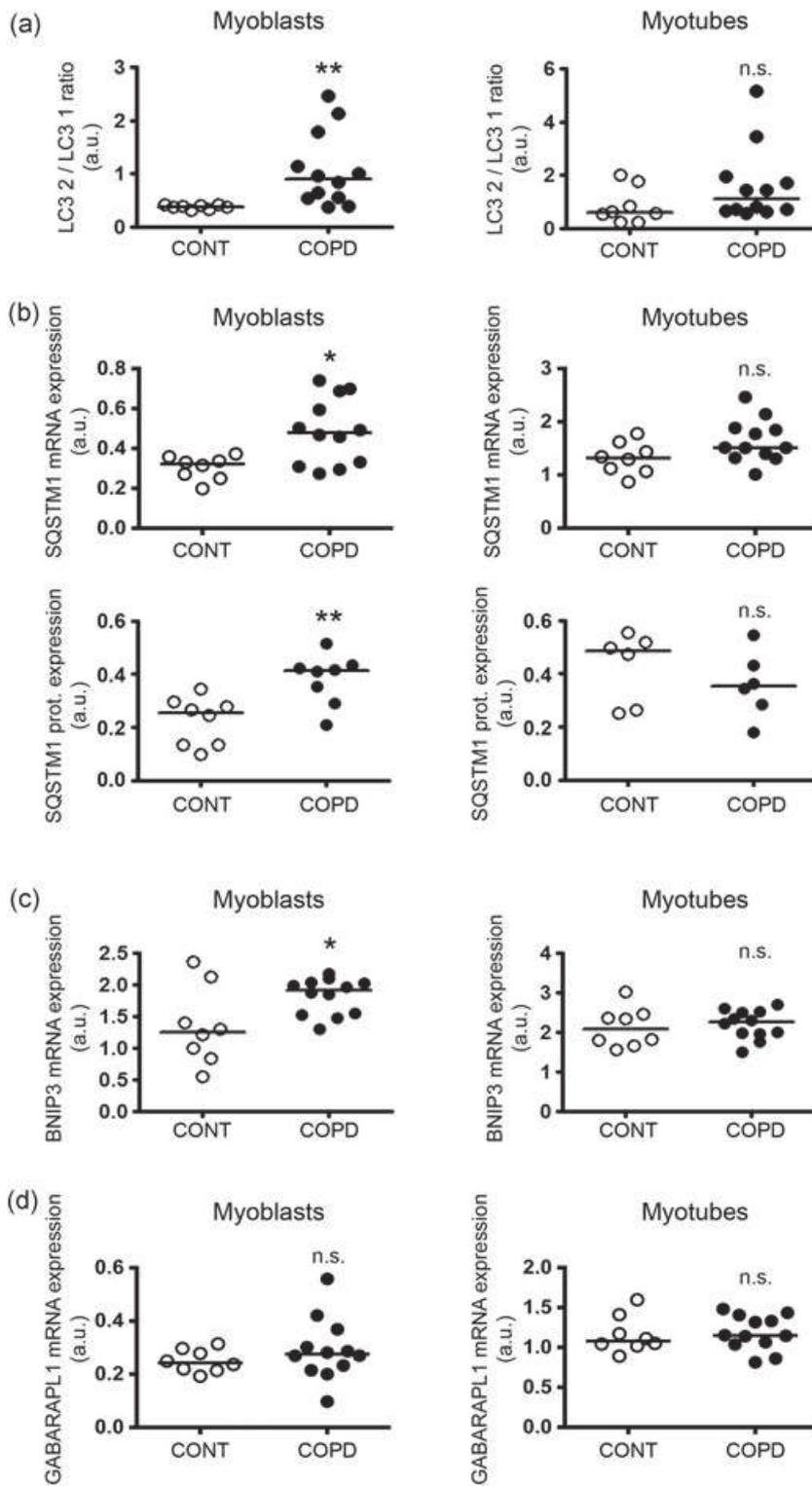


FIGURE 3 Expression of autophagy-related markers in healthy and COPD myoblasts and myotubes. (a) Analysis of the LC3 2/LC3 1 ratio, from the quantification of two independent western blots, in eight control healthy (CONT) and twelve COPD (COPD) myoblasts and myotubes. The mean values are presented in arbitrary units. Expression levels (arbitrary unit) of SQSTM1 mRNA and protein (b), BNIP3 mRNA (c) and GABARAPL1 mRNA (d), in myoblasts and myotubes derived from healthy subjects and patients with COPD. (*) and (**) indicate statistical significance at $p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively. (n.s.) indicates statistically nonsignificant. The medians are indicated. COPD, chronic obstructive pulmonary disease

3.3 | Atrophy is reduced in 3-MA-treated COPD myotubes

To investigate the involvement of autophagy in the atrophy of the cultured COPD myotubes, the autophagy inhibitor 3-MA was added to the culture medium of the myotubes derived from twelve patients with COPD. Treatment induced the inhibition of autophagy signaling

as depicted by the significant decrease in SQSTM1 and BNIP3 ($p = 0.001$, $p = 0.017$, respectively; Figure 6a), and a tendency to a decreased expression of GABARAPL1 ($p = 0.060$; Figure 6a). Representative images of COPD myotubes cultured in the absence and the presence of the autophagy inhibitor are shown in Figure 6b. Analysis of the COPD cultures indicated that 3-MA significantly increased the myotube diameter ($p < 0.001$; Figure 6b). However, 3-MA treatment

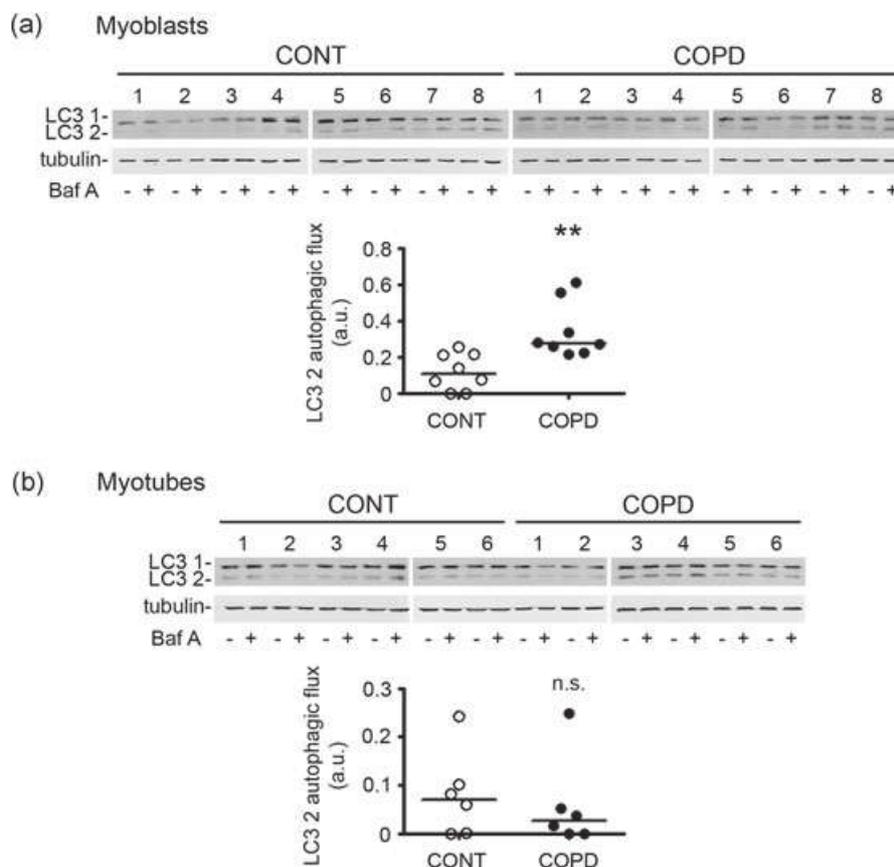


FIGURE 4 LC3 2 autophagic flux in healthy and COPD myoblasts and myotubes. (a) Representative western blots showing the expression levels of LC3 1, LC3 2 and tubulin in cultured myoblasts derived from eight control healthy subjects (CONT 1–8) and eight patients with COPD (COPD 1–8) in absence or in presence of bafilomycin A1, and analysis of the LC3 2 autophagic flux in the eight control healthy (CONT) and eight COPD (COPD) myoblasts. (b) Representative western blots showing the expression levels of LC3 1, LC3 2 and tubulin in cultured myotubes derived from six control healthy subjects (CONT 1–6) and six patients with COPD (COPD 1–6) in absence or in presence of bafilomycin A1, and analysis of the LC3 2 autophagic flux in the six control healthy (CONT) and six COPD (COPD) myoblasts. (***) indicates statistical significance at $p < 0.01$. (n.s.) indicates statistically nonsignificant. COPD, chronic obstructive pulmonary disease

of cultured myotubes derived from healthy subjects did not increase the myotube diameter ($p = 0.641$; Figure 6c). Interestingly, treatment of the COPD myotubes with the autophagy inhibitor 3-MA could increase their diameter to a level similar to the diameter of healthy myotubes (Figure 6b,c, lower panels).

3.4 | Atrophy is decreased in acid ascorbic-treated COPD myotubes

We previously reported that antioxidant treatment of COPD muscle cells with ascorbic acid significantly decreased ROS concentration and oxidative stress-induced cellular damage, and increased myotube diameter (Pomiès et al., 2016) ($p < 0.001$, $p = 0.019$, $p < 0.001$, respectively; Figure 7a). To determine whether oxidative stress is also involved in the elevated autophagy signaling of COPD muscle cells, we assessed the effect of ascorbic acid treatment of COPD muscle cells on the expression of autophagy-related markers. As shown in Figure 7b, the antioxidant treatment induced a significant decrease in the LC3 2/LC3 1 ratio and the SQSTM1 and BNIP3 expression levels ($p = 0.037$, $p < 0.001$, $p < 0.001$, respectively). No

variation was observed for GABARAPL1 expression ($p = 0.998$; Figure 7b).

4 | DISCUSSION

Although oxidative stress has been shown to regulate autophagy signaling in skeletal muscles, its involvement in the skeletal muscle autophagy of patients with COPD has never been demonstrated. In the current study, we used a cellular model to show that autophagosome formation was increased in COPD myoblasts and myotubes compared with healthy control cells (Figures 1 and 2), along with increased expression of autophagy markers and enhanced autophagic flux in COPD myoblasts (Figures 3 and 4). We also showed that in vitro autophagy signaling was correlated with the autophagy signaling observed in the quadriceps of the study subjects (Figure 5). Use of the 3-MA autophagy inhibitor confirmed the involvement of the autophagy pathway in the atrophy of cultured COPD myotubes (Figure 6). Most interestingly, the use of an antioxidant molecule on COPD myotubes, which resulted in a

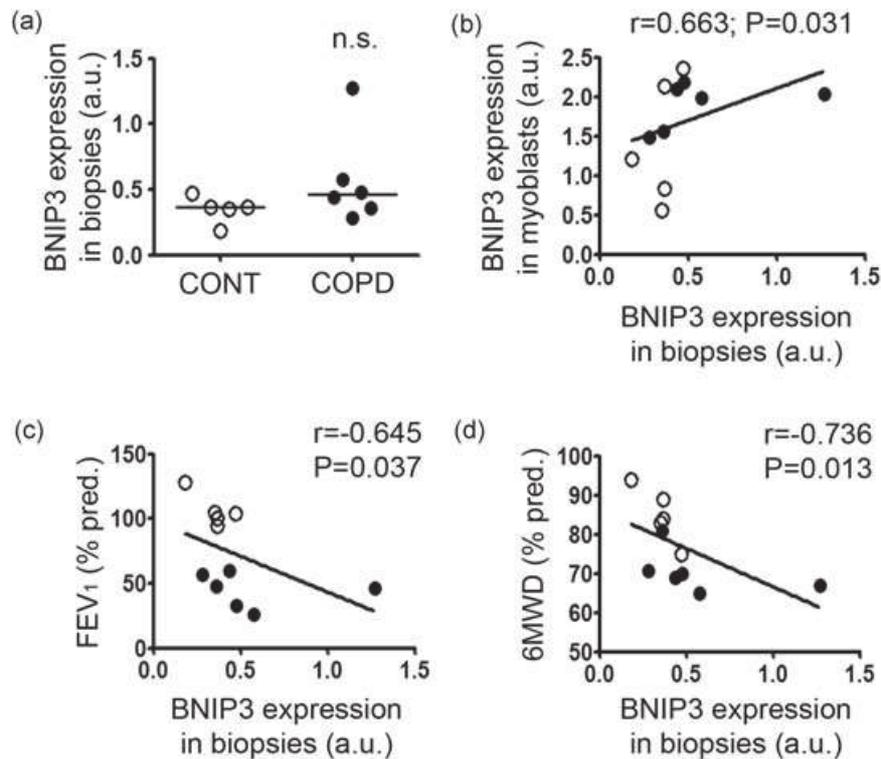


FIGURE 5 BNIP3 expression levels in the quadriceps of healthy subjects and patients with COPD. (a) Expression levels of BNIP3 in the quadriceps biopsies obtained from five healthy subjects and six patients with COPD of our study groups. (n.s.) indicates statistically nonsignificant. The medians are indicated. (b) Statistical analysis showing the correlation between BNIP3 quadriceps expression and BNIP3 expression in cultured myoblasts derived from the same healthy subjects and patients with COPD. Statistical analysis showing correlations between BNIP expression in the quadriceps and (c) FEV₁ (% predicted) and (d) 6MWD (% predicted) of the healthy subjects and patients with COPD. Healthy subjects: open circles; patients with COPD: filled circles. COPD, chronic obstructive pulmonary disease; FEV₁, forced expiratory volume in 1 s; 6MWD, 6-min walking distance

decrease of ROS concentration and an increase in myotube diameter, induced a significant decrease in autophagy signaling (Figure 7). Taken together, our findings showed that autophagy signaling was increased in cultured COPD muscle cells, where it played a role in the atrophy of COPD myotubes *in vitro*, and that oxidative stress was involved in COPD muscle autophagy.

Muscle dysfunction and atrophy are common processes that have been associated with a decreased survival rate in patients with COPD independent of the pulmonary obstruction (Marquis et al., 2002). Atrophy of the lower limb muscles of patients has been shown to result mostly from elevated protein degradation due to increased ubiquitin/proteasome signaling (Doucet et al., 2007; Plant et al., 2010). Recently, autophagosome formation and autophagy marker expression were shown to be increased in the quadriceps of both, patients with COPD with mild to severe airflow obstruction (Guo et al., 2013) and patients with cachectic COPD (Puig-Vilanova et al., 2015), compared with healthy subjects. Furthermore, autophagosome formation was inversely correlated with FEV₁ (% predicted), whereas the LC3 2/LC3 1 ratio was negatively correlated with the thigh cross-sectional area, suggesting a link between autophagy-associated muscle degradation and COPD muscle atrophy, with a protective role of autophagy toward muscle function (Guo et al., 2013). Our *in vitro* studies showed that autophagosome formation,

autophagy-related marker expression, and autophagic flux were enhanced in COPD myoblasts and/or myotubes compared with muscle cells derived from sedentary healthy subjects (Figures 1-4). However, since SQSTM1 is an adapter protein of the autophagic degradation process, one could expect a decrease in expression of SQSTM1 in COPD muscle cells. Nevertheless, our result showing increased expression of SQSTM1 in COPD myoblasts (Figure 3) is in agreement with the enhanced expression of mRNA and protein SQSTM1 observed in the vastus lateralis of patients with COPD (Guo et al., 2013). Furthermore, it has been shown that an enhanced expression of SQSTM1 can occur in parallel with activated autophagic flux in some situations, including autophagy activation in cardiac proteinopathy (Zheng, Su, Ranek, & Wang, 2011) and autophagy induction, contributing to muscle wasting in mouse models of cancer cachexia (Penna et al., 2013). It is, therefore, reasonable to think that in COPD muscle cells, an increased expression of SQSTM1 is associated with an enhanced autophagic flux.

Unlike a previous report (Guo et al., 2013), we did not detect a significant difference in the quadriceps expression of BNIP3 in healthy subjects and patients with COPD, but this discrepancy might be due to the relatively low number of quadriceps biopsies available for our study. In their study, Guo et al. (2013) found an inverse

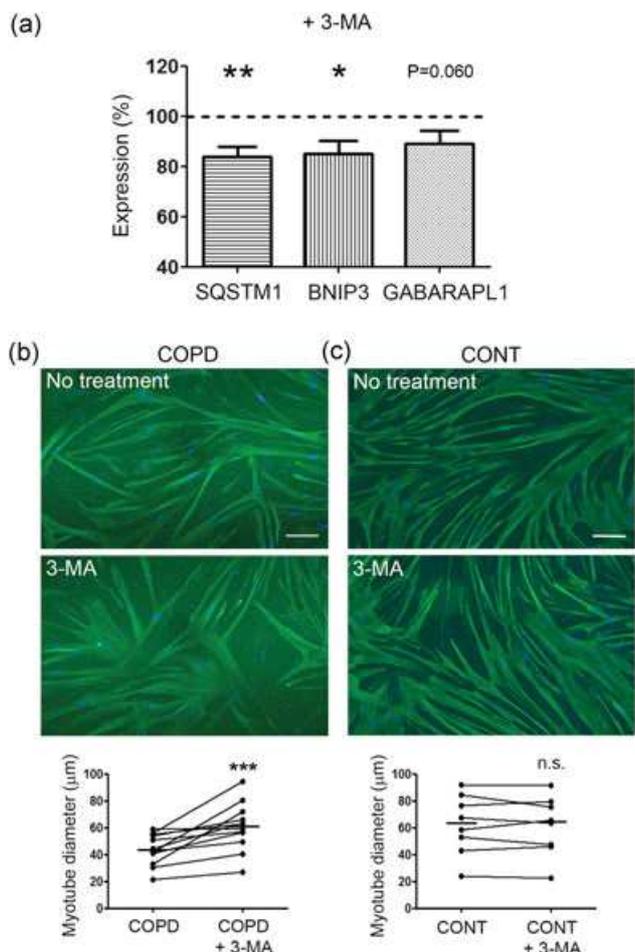


FIGURE 6 Expression levels of autophagy-related markers and myotube diameter after 3-MA treatment of COPD and healthy myotubes. (a) SQSTM1, BNIP3, and GABARAPL1 expression levels in myotubes derived from twelve patients with COPD with 3-MA treatment, relative to the expression levels of the same markers without treatment (dotted line). The means \pm SEM are indicated. (b) Representative images of COPD myotubes without or with 3-MA treatment, and analysis of the variation of the diameter of myotubes derived from twelve patients with COPD after 3-MA treatment. (c) Representative images of healthy myotubes without or with 3-MA treatment, and analysis of the variation of the diameter of myotubes derived from eight healthy subjects after 3-MA treatment. The medians are indicated. (*), (**), and (***) indicate statistical significance at $p < 0.05$, $p < 0.01$ and $p < 0.001$, respectively. (n.s.) indicates statistically nonsignificant. Bar = 200 μ m. COPD, chronic obstructive pulmonary disease; 3-MA, 3-methyladenine; SEM, standard error of the mean [Color figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

correlation between markers of autophagosome formation (autophagosomes/field, LC3 intensity, LC3 2/LC3 1 ratio) in the lower limb muscles and lung and muscle function (FEV1 [% predicted], FEV1/forced vital capacity [%], thigh cross-sectional area). In our study, we observed similar significant correlations between autophagy signaling (BNIP3 expression) in the quadriceps and FEV1 (% predicted) and δ MWD (% predicted; Figure 5), although our experimental study would have benefited from a larger population of patients with COPD with various severities. We also observed a

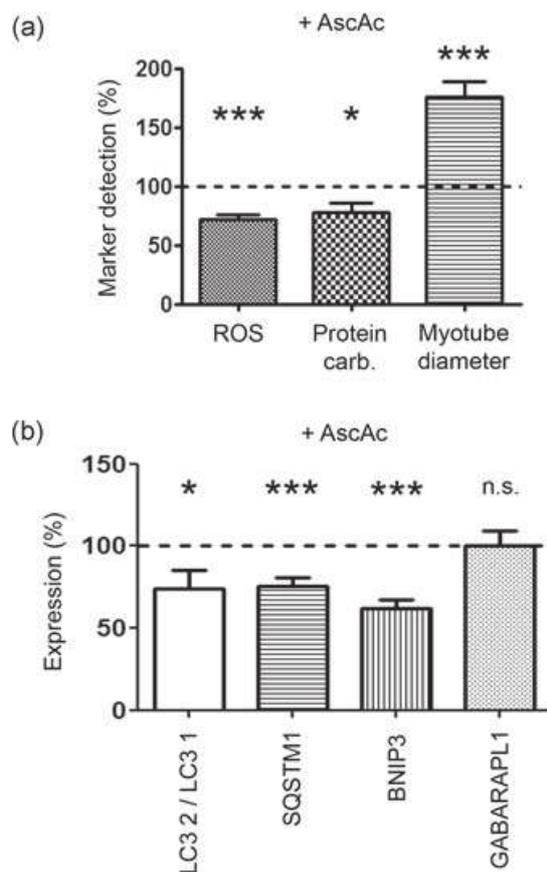


FIGURE 7 Expression levels of autophagy-related markers in COPD myotubes after ascorbic acid treatment. (a) Analysis of ROS concentration, protein carbonylation level and myotube diameter in cultured myotubes derived from twelve patients with COPD after ascorbic acid treatment, relative to the detection of the same markers without treatment (dotted line). (b) Analysis of the LC3 2/LC3 1 ratio, and SQSTM1, BNIP3 and GABARAPL1 expression levels in cultured myotubes derived from twelve patients with COPD with ascorbic acid treatment, relative to the expression levels of the same markers without treatment (dotted line). (*) and (***) indicate statistical significance at $p < 0.05$ and $p < 0.001$, respectively. (n.s.) indicates statistically nonsignificant. The means \pm SEM are indicated. COPD, chronic obstructive pulmonary disease; ROS, reactive oxygen species; SEM, standard error of the mean

correlation between BNIP3 expression in the quadriceps of the study subjects and BNIP3 expression in the cultured myoblasts (Figure 5). Together, these observations indicate that the increased autophagy signaling we identified in the cultured COPD muscle cells derived from human satellite cells reflects the enhanced autophagy observed in the quadriceps muscle of the stable patients with COPD (Guo et al., 2013; Puig-Vilanova et al., 2015).

Autophagy, a major catabolic process in the elimination of damaged molecules and organelles, plays a crucial role in muscle cell homeostasis. A relationship between autophagy and atrophy has been demonstrated in skeletal muscles subjected to various atrophic stimuli such as starvation and denervation (Mizushima et al., 2004; O'Leary et al., 2012). In the skeletal muscles of patients with COPD, it was proposed that enhanced autophagy participates in the

remodeling of the muscle, contributing to muscle atrophy (Hussain & Sandri, 2013). In our study, treatment of atrophic COPD myotubes with the autophagy inhibitor 3-MA induced a drastic increase in the myotube diameter, showing that autophagy was involved in the atrophy of COPD muscle cells in vitro (Figure 6).

Although the pro-oxidant molecule, hydrogen peroxide, has been shown to activate autophagy in cultured C2C12 myotubes (McClung, Judge, Powers, & Yan, 2010; Rahman et al., 2014), administration of the antioxidant molecule NAC to mice reduced the autophagy signaling (Qi et al., 2014; Rahman et al., 2014), suggesting that oxidative stress regulates skeletal muscle autophagy. Direct evidence of the involvement of oxidative stress in skeletal muscle autophagy was reported in a study using a transgenic mouse model expressing a mutant of the antioxidant enzyme superoxide dismutase 1 selectively in skeletal muscle (Dobrowolny et al., 2008). Nevertheless, the involvement of oxidative stress in COPD muscle autophagy has never been studied. Here, we showed that antioxidant treatment of COPD myotubes with ascorbic acid significantly decreased ROS concentration, oxidative stress-induced cellular damage, as well as expression of various autophagy markers, and increased the myotube diameter (Figure 7). Therefore, lowering the oxidative burden in COPD muscle cells reduced the autophagy signaling, showing for the first time that the oxidative stress level regulates autophagy in COPD skeletal muscle cells. This result suggests that reduction of autophagy by antioxidant molecules might be a potential therapeutic strategy to counteract oxidative stress-induced atrophy in patients with COPD.

Mitophagy is an autophagic process dedicated to the selective elimination of damaged and dysfunctional mitochondria to avoid excessive ROS generation and preserve muscle homeostasis (Youle & Narendra, 2011). In COPD skeletal muscles, it was shown that the altered functioning of mitochondria led to enhanced mitochondrial ROS production linked to skeletal muscle oxidative stress (Puente-Maestu et al., 2009, 2012). It would, therefore, be of interest to determine whether the increased ROS concentration we have observed in cultured COPD myoblasts and myotubes is coming from altered mitochondria. Furthermore, our results showed that the expression levels of SQSTM1 and BNIP3, two molecular adapters targeting mitochondria to autophagosomes for mitophagy, were increased in cultured COPD muscle cells compared with healthy control cells (Figure 3), and that ascorbic acid reduced their expression (Figure 7). These results suggest that oxidative stress is involved in the autophagy-associated remodeling of the mitochondrial network by the removal of dysfunctional mitochondria in the atrophic COPD muscle cells, a process that will be addressed in a forthcoming study.

In summary, we assessed autophagosome formation, autophagy marker expression, and autophagic flux and showed that autophagy signaling was enhanced in cultured muscle cells derived from patients with COPD compared with those from healthy subjects, reflecting the increased autophagy signaling observed in the quadriceps of patients with COPD. Furthermore, treatment of COPD myotubes with an autophagy inhibitor significantly decreased their atrophic phenotype, confirming the involvement of autophagy in the atrophy

of COPD muscle cells. Last, antioxidant treatment diminished the ROS concentration and the autophagy signaling and increased the COPD myotube diameter. These data are therefore the first evidence that the oxidative stress level contributes to the regulation of autophagy in COPD muscle cells and that autophagy may be involved in the atrophy of COPD skeletal muscles. While little information is available on how oxidative stress levels affect autophagy in muscle, such in vitro approaches should help us to decipher this signaling pathway in COPD muscles.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Nicolas Molinari (IMAG, Montpellier, France) for his advice on statistical analysis, and the Fontalvie/5-Santé Group for the use of their facilities during the clinical evaluation and biopsies of the patients with COPD. We also acknowledge Chantal Cazevielle for her expertise with electron microscopy (Centre de Ressources en Imagerie Cellulaire de Montpellier, France).

CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare that they have no conflict of interests.

ORCID

Pascal Pomiès  <http://orcid.org/0000-0002-5301-6087>

REFERENCES

- Bellot, G., Garcia-Medina, R., Gounon, P., Chiche, J., Roux, D., Pouyssegur, J., & Mazure, N. M. (2009). Hypoxia-induced autophagy is mediated through hypoxia-inducible factor induction of BNIP3 and BNIP3L via their BH3 domains. *Molecular and Cellular Biology*, *29*, 2570–2581.
- Celli, B. R., Cote, C. G., Marin, J. M., Casanova, C., Montes de Oca, M., Mendez, R. A., ... Cabral, H. J. (2004). The body-mass index, airflow obstruction, dyspnea, and exercise capacity index in chronic obstructive pulmonary disease. *The New England Journal of Medicine*, *350*, 1005–1012.
- Dobrowolny, G., Aucello, M., Rizzuto, E., Beccafico, S., Mammucari, C., Boncompagni, S., ... Musarò, A. (2008). Skeletal muscle is a primary target of SOD1G93A-mediated toxicity. *Cell Metabolism*, *8*, 425–436.
- Doucet, M., Russell, A. P., Léger, B., Debigaré, R., Joannisse, D. R., Caron, M.-A., ... Maltais, F. (2007). Muscle atrophy and hypertrophy signaling in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, *176*, 261–269.
- Gouzi, F., Abdellaoui, A., Molinari, N., Pinot, E., Ayoub, B., Laoudj-Chenivresse, D., ... Préfaut, C. (2013). Fiber atrophy, oxidative stress, and oxidative fiber reduction are the attributes of different phenotypes in chronic obstructive pulmonary disease patients. *Journal of Applied Physiology*, *115*, 1796–1805.
- Guo, Y., Gosker, H. R., Schols, A. M. W. J., Kapchinsky, S., Bourbeau, J., Sandri, M., ... Hussain, S. N. A. (2013). Autophagy in locomotor muscles of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, *188*, 1313–1320.
- Hussain, S. N. A., & Sandri, M. (2013). Role of autophagy in COPD skeletal muscle dysfunction. *Journal of Applied Physiology*, *114*, 1273–1281.
- Marquis, K., Debigaré, R., Lacasse, Y., LeBlanc, P., Jobin, J., Carrier, G., & Maltais, F. (2002). Midthigh muscle cross-sectional area is a better

- predictor of mortality than body mass index in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 166, 809–813.
- McClung, J. M., Judge, A. R., Powers, S. K., & Yan, Z. (2010). p38 MAPK links oxidative stress to autophagy-related gene expression in cachectic muscle wasting. *American Journal of Physiology Cell Physiology*, 298, C542–C549.
- Mizushima, N., Yamamoto, A., Matsui, M., Yoshimori, T., & Ohsumi, Y. (2004). In vivo analysis of autophagy in response to nutrient starvation using transgenic mice expressing a fluorescent autophagosome marker. *Molecular Biology of the Cell*, 15, 1101–1111.
- O'leary, M. F. N., Vainshtein, A., Carter, H. N., Zhang, Y., & Hood, D. A. (2012). Denervation-induced mitochondrial dysfunction and autophagy in skeletal muscle of apoptosis-deficient animals. *American Journal of Physiology Cell Physiology*, 303, C447–C454.
- Penna, F., Costamagna, D., Pin, F., Camperi, A., Fanzani, A., Chiarpotto, E. M., ... Costelli, P. (2013). Autophagic degradation contributes to muscle wasting in cancer cachexia. *The American Journal of Pathology*, 182, 1367–1378.
- Plant, P. J., Brooks, D., Faughnan, M., Bayley, T., Bain, J., Singer, L., ... Batt, J. (2010). Cellular markers of muscle atrophy in chronic obstructive pulmonary disease. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 42, 461–471.
- Pomiès, P., Blaquièrre, M., Maury, J., Mercier, J., Gouzi, F., & Hayot, M. (2016). Involvement of the FoxO1/MuRF1/atrogin-1 signaling pathway in the oxidative stress-induced atrophy of cultured chronic obstructive pulmonary disease myotubes. *PLoS One*, 11, e0160092.
- Pomiès, P., Rodriguez, J., Blaquièrre, M., Sedraoui, S., Gouzi, F., Carnac, G., ... Hayot, M. (2015). Reduced myotube diameter, atrophic signalling and elevated oxidative stress in cultured satellite cells from COPD patients. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 19, 175–186.
- Puente-Maestu, L., Perez-Parra, J., Godoy, R., Moreno, N., Tejedor, A., Gonzalez-Aragoneses, F., ... Agusti, A. (2009). Abnormal mitochondrial function in locomotor and respiratory muscles of COPD patients. *The European Respiratory Journal*, 33, 1045–1052.
- Puente-Maestu, L., Tejedor, A., Lázaro, A., de Miguel, J., Alvarez-Sala, L., González-Aragoneses, F., & Agustí, A. (2012). Site of mitochondrial reactive oxygen species production in skeletal muscle of chronic obstructive pulmonary disease and its relationship with exercise oxidative stress. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 47, 358–362.
- Puig-Vilanova, E., Rodriguez, D. A., Lloreta, J., Ausin, P., Pascual-Guardia, S., Broquetas, J., ... Barreiro, E. (2015). Oxidative stress, redox signaling pathways, and autophagy in cachectic muscles of male patients with advanced COPD and lung cancer. *Free Radical Biology & Medicine*, 79, 91–108.
- Qi, Z., He, Q., Ji, L., & Ding, S. (2014). Antioxidant supplement inhibits skeletal muscle constitutive autophagy rather than fasting-induced autophagy in mice. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2014, 315896.
- Rahman, M., Mofarrahi, M., Kristof, A. S., Nkengfac, B., Harel, S., & Hussain, S. N. (2014). Reactive oxygen species regulation of autophagy in skeletal muscles. *Antioxidants & Redox Signaling*, 20, 443–459.
- Youle, R. J., & Narendra, D. P. (2011). Mechanisms of mitophagy. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 12, 9–14.
- Zhang, H., Gong, Y., Wang, Z., Jiang, L., Chen, R., Fan, X., ... Kong, X. (2014). Apelin inhibits the proliferation and migration of rat PSMCs via the activation of PI3K/Akt/mTOR signal and the inhibition of autophagy under hypoxia. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 18, 542–553.
- Zheng, Q., Su, H., Ranek, M. J., & Wang, X. (2011). Autophagy and p62 in cardiac proteinopathy. *Circulation Research*, 109, 296–308.

How to cite this article: Gouzi F, Blaquièrre M, Catteau M, et al. Oxidative stress regulates autophagy in cultured muscle cells of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *J Cell Physiol*. 2018;1–11. <https://doi.org/10.1002/jcp.26868>

Etude 2: Effects of a human microenvironment on the differentiation of human myoblasts

Matthias Catteau¹, Farès Gouzi², Léo Blervaque¹, Emilie Passerieux¹, Marine Blaquièrè²,
Bronia Ayoub², François Bughin², Jacques Mercier², Maurice Hayot², Pascal Pomiès^{1*}

¹PhyMedExp, Université de Montpellier, INSERM, CNRS, Montpellier, France

²PhyMedExp, Université de Montpellier, INSERM, CNRS, CHU de Montpellier, Montpellier,
France

Publication en révision à Plos One

Abstract

Background: Myogenic differentiation mechanisms are generally assessed using a murine cell line placed in low concentrations of an animal-derived serum like fetal bovine serum (FBS). To more closely approximate *in vivo* pathophysiological conditions, recent studies have combined the use of human muscle cells with human serum. Nevertheless, the *in vitro* studies of the effects of a human microenvironment on the differentiation process of human myoblasts require experimental adjustments and optimizations. Therefore, we sought to identify the culture conditions that would provide an optimal and reproducible differentiation process of human muscle cells.

Methods: We assessed the differentiation variability resulting from the use of human myoblasts and serums from healthy subjects by measuring the myotube diameter, fusion index and surface covered by myotubes.

Results: We showed the preserved cell-dependent variability of the differentiation response of myoblasts cultured in human serums compared to FBS. We found that using a pool of serums reduced the serum-dependent variability of the myogenic response compared to individual serums, without affecting the differentiation process of the human myoblasts. We validated our methodology by showing the atrophying effect of pooled serums from COPD patients on healthy human myotubes.

Conclusions: By replacing animal-derived tissues with human myoblasts and serums, and by validating the sensitivity of cultured human muscle cells to a pathological microenvironment, this human cell culture model offers a valuable tool for studying the role of the microenvironment in chronic disease.

Introduction

The muscle alterations resulting from chronic pathologies like heart failure³⁸⁷, cancer³⁸⁸, chronic kidney disease³⁸⁹ and chronic obstructive pulmonary disease (COPD)³⁹⁰ reduce the quality of life and survival rate of patients. It has been shown that a defect in the regenerative process due to altered satellite cell function is an underlying factor of the muscle alterations³⁹¹. Modulators of satellite cell differentiation, such as chronic inflammation or unloading, are particularly involved in impaired muscle formation and regeneration^{392,393}.

Most studies in this field are performed with standardized animal myogenic cell lines (mouse C2C12 or rat L6) cultured with animal-derived serums from horse, calf or fetal bovine. Yet, questions have been raised about the relevance of these models for the study of human muscle pathologies. Notably, improvements in cell cultures, particularly through the use of human myogenic cells purified from biopsies or derived from induced-pluripotent stem cells, have shown that animal-derived cell lines are less suitable^{394,395}. Furthermore, variations in serum composition, which may well alter the reliability of results, have been reported^{396,397}.

The use of human satellite cells *in vitro* may therefore be a promising tool to replace animal cell lines in studies of muscle cell differentiation and regeneration, as doing so may more closely approximate *in vivo* pathophysiological conditions. Several research groups have thus modified their experimental parameters by using human myoblasts^{398–400}, a human microenvironment – i.e., the local environment of the muscle cell brought by blood flow (*in vivo*) or serum (*in vitro*)^{401,402} – or both^{403–405}. Nevertheless, the seeding density, differentiation durations, serum batches and cell passages are some of the factors that need to be adjusted to prevent harmful experimental heterogeneity and ensure the reproducibility of results^{406–408}. Therefore, the biological variability in human samples must be better assessed if we want to increase the reliability of studies on *in vivo* muscle alteration. Biological variability is expressed at a cellular level by the heterogeneous magnitude of differentiation of human myoblasts from different subjects⁴⁰⁹, as well as by the heterogeneous composition of different human serums compared to a controlled batch of animal serum.

Combining human muscle cells and human serums to more closely approximate *in vivo* conditions nevertheless requires a substantial amount of tissue. For this reason, satellite cell isolation from human muscle biopsies offers a quasi-inexhaustible tissue

resource, limiting the number of patient interventions and allowing preclinical drug screening⁴¹⁰. Other authors have sought to reduce the amount of serum in *in vitro* experiments, proposing that serum samples from several subjects be pooled^{401,404}. In this case, it must be kept in mind that doing so would assess the global effect of a population condition rather than an individual sample effect. Nevertheless, in the field of muscle cell cultures, it has never to our knowledge been shown that the biological effects of pooled serums are equivalent to the mean effect of individual serums.

Muscle differentiation and regeneration are precise and complex signaling programs that must be finely tuned to achieve the complete formation of muscle fibers⁴¹¹. Modifying the satellite cell microenvironment by various molecules impacts the differentiation process and leads to abnormalities like muscle atrophy. For example, adding hydrogen peroxide⁴¹², metformin⁴¹³ or tumor necrosis factor-alpha⁴¹⁴ impairs muscle differentiation of both human and mouse C2C12 myoblasts. Therefore, it is clear that a modification in the microenvironment by adding molecules is sensed by cultured muscle cells, but little is known concerning the sensitivity of human satellite cells exposed to a pathological microenvironment, particularly the human serum from patients with chronic disease.

In the present study, we sought to characterize the experimental parameters for an *in vitro* culture of human muscle cells in a human microenvironment. The first objective was to identify the culture conditions that would provide an optimal differentiation process of human myoblasts. Our second objective was to assess the cell-dependent variability of the differentiation process in different human myoblast cultures exposed to a single human serum and, conversely, the serum-dependent variability of the differentiation of a single human myoblast culture exposed to different human serums. Our third objective was to compare the differentiation response of human myoblasts exposed to individual human serums versus a pool of these serums. Last, we tested the sensitivity of our model by comparing the myogenic differentiation of healthy human myoblasts exposed to serums from healthy subjects to those from patients with COPD.

Materials and Methods

Study population

Human tissue resources were obtained from sedentary healthy subjects and COPD patients recruited in previous studies with no link to the present study^{412,400}. The institutional ethics committees of the Marseille University Hospital (Comité de protection des personnes Sud Méditerranée I - 2014-A01965-42) and the Montpellier University Hospital (Comité de

protection des personnes Sud Méditerranée IV 2011-A00842-39, 2013-A01199-36 & Comité Local d’Ethique Recherche 2017_CLER-MTP_07-19) approved the study, and the subjects, who had participated in the earlier studies, all gave written consent at that time to having their tissue samples used in complementary studies in addition to the initial studies (NCT01942889; NCT02794142; NCT03197909; NCT02040363). All research protocols were conducted in accordance with the good clinical practices detailed in the Helsinki Declaration and the European Guidelines.

The healthy subjects were recruited on the basis of the following criteria: age between 40 and 80 years, no diagnosed disease, and low physical activity per week (<150 min of moderate-to-vigorous physical activity). Age-matched COPD patients were recruited on the basis of dyspnea, chronic cough and/or sputum production, and/or a history of exposure to risk factors for the disease. Diagnosis was confirmed by forced expiratory volume in 1 s/forced vital capacity ratio (FEV₁/FVC) lower than 70% ⁴¹⁵. The dyspnea severity was assessed using the modified Medical Research Council (mMRC) scale ⁴¹⁶. Body composition and nutritional status were evaluated with the fat-free-mass index (FFMI) and/or the body mass index (BMI) ^{417,418}. Exercise capacity and exercise tolerance were respectively reflected by the VO₂peak (VO_{2P}) and the 6-minute walk distance (6-MWD) ⁴¹⁹.

Blood collection and conservation

Venous blood was collected in dry tubes on fasting subjects at rest. Blood samples were immediately centrifuged at 3,500 rpm and 4°C for 10 minutes. Serum was harvested and serum aliquots were then stored at -80°C. Prior testing the serums in *in vitro* cultures, serum aliquots were thawed on ice and mixed together in equal volumes for pooled serums.

Muscle biopsy procedure and conservation

Biopsies were performed using our routinely-used needle methodology in the *vastus lateralis* of the quadriceps of healthy subjects ³⁹⁴. Briefly, after local anesthesia (2 ml of lidocaine 2%), the quadriceps muscle was incised with a scalpel 15 cm from the patella/kneecap, and a piece of fresh biopsy was obtained with a biopsy needle. To preserve cell integrity, the biopsy samples were progressively frozen in a Mr. Frosty freezing container (Nalgene Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA) to -80°C for 24 hours and then placed in liquid nitrogen until myoblast purification ⁴⁰⁹.

Myoblast isolation and purification

As previously described^{409,420}, satellites cells were isolated by placing a small explant of a muscle biopsy in a 35-mm collagen-coated Petri dish covered with 6 mg/ml of Matrigel (BD Matrigel Matrix from BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA). The isolation medium was composed of DMEM (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) supplemented with 20% FBS (Dominique Dutscher SAS, Burmath, France), 0.5% Ultrosor G (Pall Biosepra, Cergy-Saint-Christophe, France) and 20 mM Hepes (Sigma-Aldrich). Explants were cultivated for 6-8 days in standard conditions (37°C/5% CO₂/21% O₂), and outgoing cells were harvested using dispase (BD Biosciences) and grown in 100-mm collagen-coated Petri dishes with growth medium (GM; DMEM/20% FBS/0.5% Ultrosor G).

After incubation with an anti-CD56 antibody coupled with magnetic beads (BD Biosciences) for 30 minutes, satellites cells were purified with a magnetic sorting system (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany). The purified myoblasts (passage 1) were grown in a 100-mm collagen-coated dish in GM and frozen at passage 2. All experiments were performed using myoblasts below passage 4.

Human muscle cell cultures

Myoblasts were thawed in 100-mm Petri dishes containing GM for 48 hours. Myoblasts were then seeded in 6-well Petri plates and grown for 48 hours. Differentiation into myotubes was induced by placing the cells in differentiation medium (DM; DMEM/2% FBS or horse serum or human healthy serum [hHS] or COPD serum) for 5 days, with a change of the medium at day 2 of the differentiation process.

Myoblast characterization

Myoblasts, seeded at 10,000 cells/well onto 12-well collagen-coated plates, were grown in DMEM/2% FBS or pooled human healthy serums for 72 hours. Cells were then harvested, mixed with trypan blue dye (Sigma-Aldrich) and counted with a brightfield cell counter (CellDrop BF; DeNovix, Wilmington, DE, USA). The viability corresponds to the ratio between the viable cells and the total cell number (viable + dead cells). The doubling time in hours was calculated as: $72 / ((\ln x / 10,000) / \ln 2)$, with x the number of viable cells at the end of the culture.

Fluorescence microscopy

For immunofluorescence microscopy, the myotubes were washed with PBS at 37°C and fixed in PBS/3.7% paraformaldehyde. After washing, cells were permeabilized with PBS/0.1% Triton X-100 and then incubated with a mouse monoclonal anti-troponin T antibody 1/200 (Sigma-Aldrich) for 1 hour at 37°C. After washing, the second incubation was performed using an anti-mouse antibody coupled with Alexa Fluor 546 (Sigma-Aldrich) and Hoechst 33258 (Sigma-Aldrich) for 1 hour at 37°C. Myotubes were washed and coverslipped using Fluoroshield mounting medium (Sigma-Aldrich). At least 7-9 images were captured at a 5X magnification on a Zeiss AxioImager M1 Microscope (CarlZeiss) coupled with an AxioCam MRm CCD camera (CarlZeiss, Oberkochen, Germany) driven by AxioVision 4 software (CarlZeiss). Using ImageJ software (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA), the myotube counting/detachment/diameter, fusion index and covered surface were assessed. Myotube counting consisted of assessing the number of troponin T-positive (TnT⁺) myotubes normalized to total TnT⁺-positive cells (5 pictures/condition). We considered cells as myotubes when the cells were TnT⁺ with ≥ 3 nuclei. Myotube detachment was evaluated by counting areas containing peeled-off myotubes (10 images/condition). For diameter analysis, 180 myotubes from 9 anonymized images were analyzed (except for the seeding density experiment [Fig. 1], 200 myotubes from 10 images) by taking 3 measures of the apparent diameter along each myotube, as previously described^{409,412}. We determined the differentiation state using the myogenic fusion index, which entails counting the number of nuclei contained in the myotubes over the total of nuclei per each image⁴²⁰. At least 5,000 nuclei in 9 images were counted per condition. The myotube covered surface was determined by quantifying the percentage of the surface covered by myotubes per field in 9 images per condition⁴²⁰.

Statistical analysis

The myotube diameter, fusion index and myotube covered surface are expressed as mean \pm SD or SEM depending on the experiment (see the figure legends for details). For the cell-dependent variability experiments, a Fisher's F-test (for variabilities) and a paired Student's t-test (for means) were performed to compare the myotube diameter, fusion index and myotube covered surface between cells differentiated in FBS and hHS conditions. Variability was also assessed by computing the coefficient of variation (C.V=standard deviation/mean). For the serum-dependent variability experiments, we proceeded to a one

sample t-test inference to compare the myotube diameter, fusion index and myotube covered surface of cells differentiated in hHS conditions to the reference values obtained in FBS condition (n=3 experiments). Regarding the non-normal distribution, we proceeded to a natural logarithm transformation in order to perform a linear mixed model on all myotube diameters for multilevel analysis ⁴²¹. All distribution frequency analyses were supported by a Kolmogorov-Smirnov test. The reproducibility of myotube diameter, fusion index and myotube surface measurements was assessed with Bland-Altman 95% limits of agreement ^{422,423}. Statistical analyses were performed with GraphPad Prism 6 software.

Results

Culture conditions providing optimal differentiation of human myoblasts

The classic *in vitro* approach to study myoblast differentiation is based on immortalized muscle cell lines exposed to a microenvironment containing growth factors from animal serum. In previous studies, we induced the differentiation of primary human myoblasts by growing them in a low concentration of FBS ^{409,412}. However, according to the literature, it is important to control the various factors that induce experimental variability: cell passage number ⁴²⁴, FBS batch ³⁹⁷, differentiation duration and number of seeded cells ^{400,412,420}. We addressed these issues by exclusively using human myoblasts below passage 4, a single FBS batch for all experiments, a standard differentiation duration of 5 days, and the induction of differentiation when the cells reached 80% confluence. Under these conditions, we assessed the reproducibility of the measures of several differentiation characteristics: the myotube diameter, the fusion index, and the surface covered by myotubes were measured in the muscle cell cultures from five healthy subjects in two independent experiments. Each measurement was compared using a Bland-Altman plot (S1A-C Fig). For the three differentiation characteristics, all the values were within the limits of agreement and a bias of less than 5% indicated no major systematic error (S1A-C Fig). In addition, the cumulative relative frequency analysis of the myotube diameters showed no significant difference between the myotube distributions in the two experiments (p=0.26, S1D Fig).

To more closely approximate *in vivo* conditions, we assessed the differentiation characteristics of the human muscle cells in a human microenvironment by replacing the FBS with human serum from healthy subjects. We thus induced the differentiation of myoblasts from a single healthy subject, seeded at various densities, in presence of DM supplemented with a pool of serum from eight healthy subjects. Five days after

differentiation induction, we assessed the number of myotubes per field and the number of detaching myotubes (Table 1, Fig 1A). We found that the 5,000 cells/cm² condition offered the best condition for differentiation, with a high percentage of myotubes per field (88.9%) indicating the highest number of formed myotubes per field (54.2 ± 7.9), in association with a low number of detaching myotubes (0.6 ± 1.3 /field). Indeed, a lower number of seeded cells resulted in a low percentage of myotubes (69%), while a higher number of seeded cells showed equivalent percentages of myotubes (from 89.1% to 93.6%) associated with the highest number of detaching myotubes (≥ 1.0 /field). Using the 5,000 cells/cm² condition, we obtained a myotube diameter (60 ± 3.1 μ m) and a fusion index ($68 \pm 3\%$) within the range described in previous studies^{403,405,409} (Fig 1B).

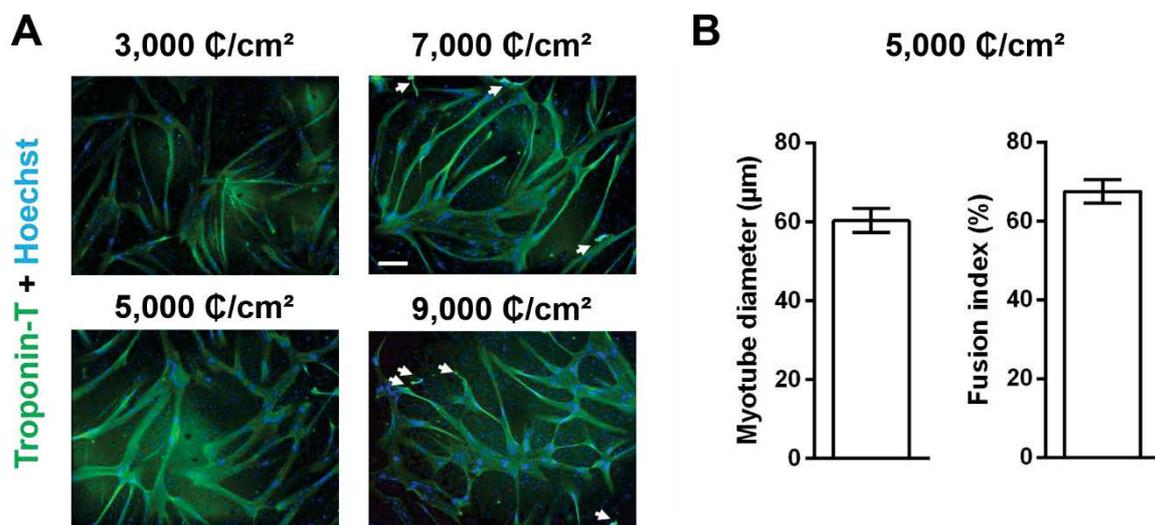


Fig 1. Seeding density for the differentiation of human myoblasts in a human microenvironment. (A) Representative pictures of myotubes from a single healthy subject differentiated in hHS. Myoblasts were seeded at 3,000, 5,000, 7,000, and 9,000 cells/cm² and differentiated in 2% of a pool of eight hHS. Morphology of the myotubes was observed with fluorescent microscopy using anti-troponin-T (green) and Hoechst (blue) staining. White arrows indicate cell detachment. (B) Morphological analysis of myotubes differentiated with an initial seeding of 5,000 cells/cm²: the myotube diameter (n=200 myotubes) and the fusion index are expressed in mean \pm SEM. Bar = 200 μ m

Table 1. Formation of myotubes in differentiation medium supplemented with hHS

Seeded cellular density	Number of TnT ⁺ - cells/field (mean±SD)	Myotubes (%)	Number of detaching myotubes/field (mean±SD)
	-With ≥3 nuclei/cell = myotube -With <3 nuclei/cell		
3,000 cells/cm ²	41.4±15.9	69.0	0.3±0.7
	18.6±0.9		
5,000 cells/cm ²	54.2±7.9	88.9	0.6±1.3
	6.8±3.1		
7,000 cells/cm ²	49.0±12.7	89.1	1.1±1.4
	6.0±2.7		
9,000 cells/cm ²	48.2±9.8	91.6	1.0±1.1
	4.4±8.9		
11,000 cells/cm ²	38.2±7.6	93.6	1.3±1.7
	2.6±2.2		

TnT⁺ : Troponin-T positive

Cell-dependent variability of the differentiation process of human myoblast cultures

Using the 5,000 cells/cm² condition, we investigated the variability of the differentiation process by exposing the human muscle cells from seven healthy subjects (Table 2) for 5 days to DM supplemented with a single hHS or FBS (experimental design in Fig 2A). To evaluate the differentiation response of the seven myoblast cultures, we assessed the fusion index, the surface covered by myotubes and the myotube diameter. The myotubes differentiated in hHS as opposed to FBS showed a higher fusion index (65.4±11.8 vs 58±10.7%, p=0.005; Fig 2B) and also tended to cover a greater surface (39.5±7.3 vs 33.1±6.3, p=0.058; Fig 2C). Despite these morphological differences, the hHS preserved the intrinsic variability of the differentiation response compared to FBS, and this was reflected by equivalent C.Vs for the fusion index (18.1 vs 18.4%, p=0.81; Fig 2B) and myotube surface (18.5 vs 19.0%, p=0.72; Fig 2C). Under the same experimental conditions, hHS tended to increase the myotube diameter by 24% (58±18 vs 47±18 μm, p=0.064, Fig 2D) without affecting the C.V of the myotube cultures (30.5 vs 38.0%, p=0.99; Fig 2D). However, the linear mixed model showed that hHS increased the mean myotube diameter due to an increased proportion of intermediate-to-large myotubes (p<0.001, S2 Fig). Indeed, the use of hHS induced a shift in the distribution curve toward higher myotube diameters (Fig 2E). Furthermore, cumulative frequency analysis of the myotube diameters showed a significant difference between FBS and hHS (p<0.001), with 50% of the myotubes

differentiated in FBS measuring less than 37.7 μm , whereas those in hHS had a diameter under 46.5 μm (Fig 2F).

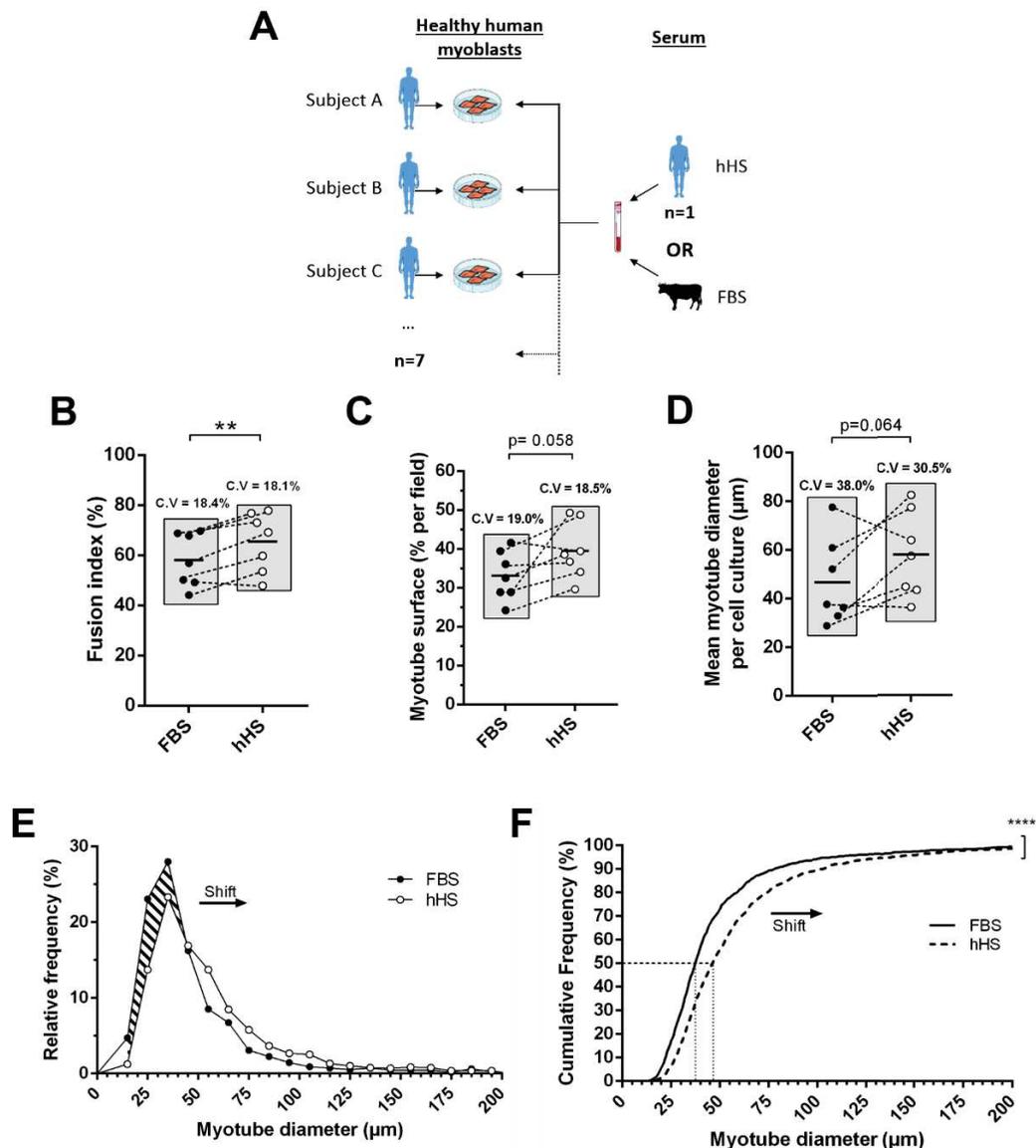


Fig 2. Effects of a single hHS compared to FBS on the differentiation characteristics of healthy myotubes. The experimental design is schematically presented in (A). Quantification of (B) the fusion index, (C) myotube surface and (D) myotube diameter analysis of muscle cells from seven different healthy subjects differentiated in medium containing 2% FBS or a single hHS (dotted lines link muscle cell cultures from the same subject). The gray rectangles represent the range of the coefficient of variation (C.V). The means are indicated and (**) indicates statistical significance at $p < 0.01$ between myoblasts differentiated in FBS or hHS. (E) Distribution frequency analysis and (F) cumulative frequency analysis of the myotube diameters obtained after differentiation of myoblasts from seven healthy subjects in presence of 2% FBS or a single hHS. For distribution and cumulative frequency analysis, data are expressed in percentage of all myotube diameters per condition and (****) indicates statistical significance at $p < 0.0001$ with Kolmogorov-Smirnov's distribution test.

Table 2. Characteristics of healthy subjects

Characteristics	Healthy subjects n=7
Age (y)	60±4
BMI (kg/m²)	25±3
<i>Weight (kg)</i>	77.9±9.2
<i>Height (cm)</i>	177±4
FFMI (kg/m²)	19±2
VO_{2P} (ml.min⁻¹.kg⁻¹)	30±4
<i>(%pred)</i>	108±16
6-MWD (m)	622±30
<i>(%pred)</i>	88±9

BMI : Body Mass Index. FFMI : Fat-Free Mass Index. VO_{2P} : VO₂ Peak.

6-MWD : 6-Minute Walk Distance. Pred : Predictive Value.

Serum-dependent variability of the differentiation process of a human myoblast culture

We also investigated the variability of several human serums to induce myogenic differentiation by differentiating the myoblasts from a single healthy subject in presence of eight individual hHS (experimental design in Fig 3A). Compared with the reference values obtained with FBS, the myotubes exposed to individual hHS showed an increase in myotube diameter (+55%, $p < 0.001$; Fig 3B), fusion index (+25%, $p < 0.0001$; Fig 3C) and covered surface (+43%, $p < 0.01$; Fig 3D), with C.Vs of 17.6%, 6.9% and 17.3%, respectively.

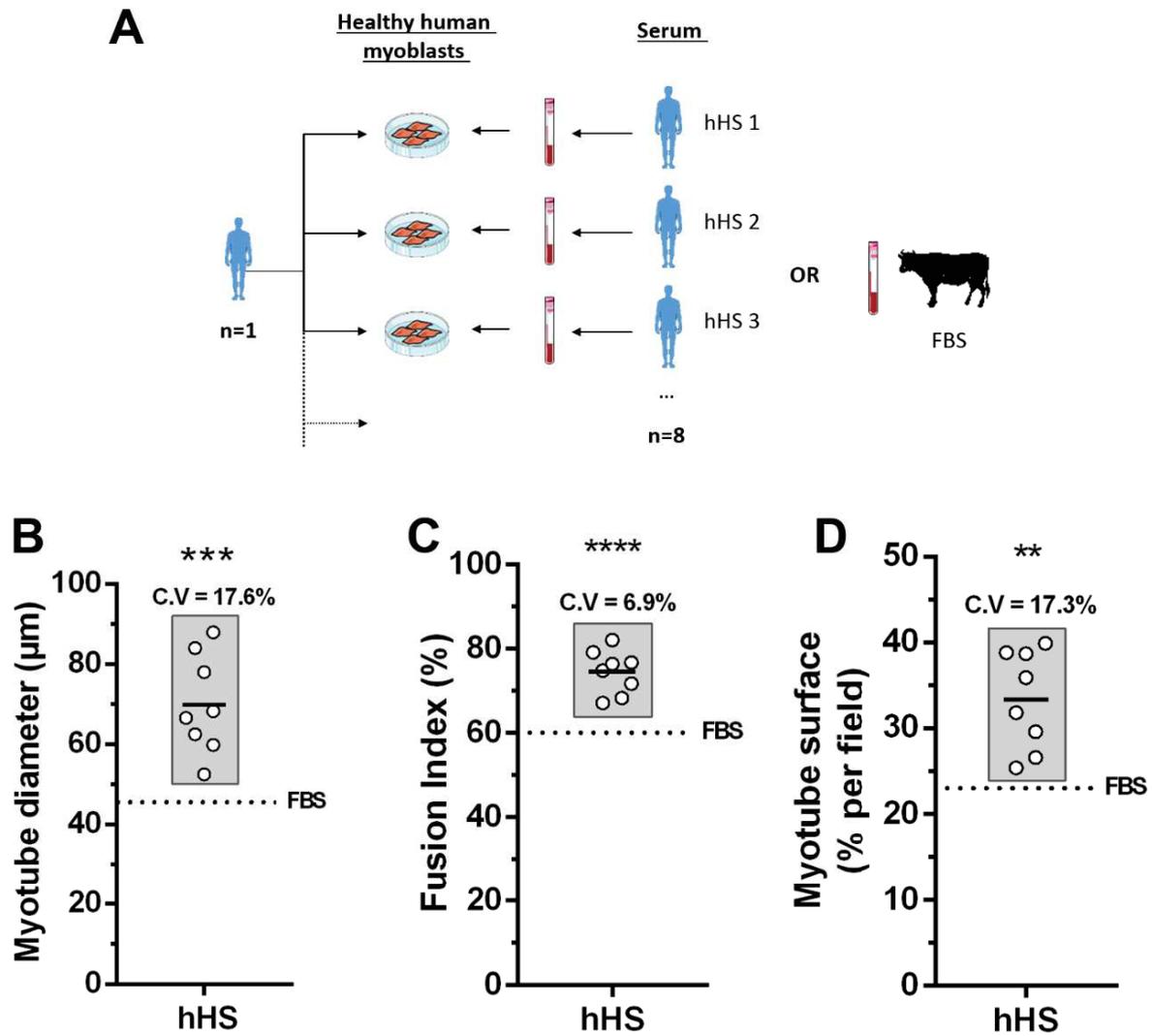


Fig 3. Effects of eight hHS compared to FBS on the differentiation characteristics of myotubes from a single healthy subject. The experimental design is schematically presented in (A). (B) The myotube diameter, (C) fusion index and (D) myotube surface were quantified from cultures of myoblasts from a single healthy subject differentiated in medium containing 2% FBS (dotted line) or eight different hHS. Data are expressed in mean±SD and the gray rectangles represent the range of the coefficient of variation (C.V). (**), (***) and (****) indicate statistical significance at $p < 0.01$, $p < 0.001$ and $p < 0.0001$ respectively, between values obtained for myotubes differentiated in FBS and individual hHS.

Differentiation response of human myoblasts exposed to individual human serums or pooled serums

To reduce the serum-dependent variability, we assessed the effects of pooled human serums on the differentiation characteristics of the myoblasts, as performed by other groups^{401,404}. We thus compared the effects of eight individual hHS to the effects of a pool of the same eight serums (experimental design in Fig 4A). Use of the pooled serums reduced the C.Vs of each measurement (17.6 to 2.9% for myotube diameter, 6.9 to 1.7% for fusion index, and 17.3 to 0.6% for covered surface; Table 3, Fig 4B-D) without affecting the ability to induce myotube differentiation. Indeed, both pooled and individual serums retained an equivalent ability to induce fusion with similar trophic effects on myotube diameter (61 vs 69 μm , $p=0.09$; Fig 4B), fusion index (71.1 vs 74.5%, $p=0.10$; Fig 4C), and surface covered by myotubes (36.0 vs 33.4%, $p=0.24$; Fig 4D).

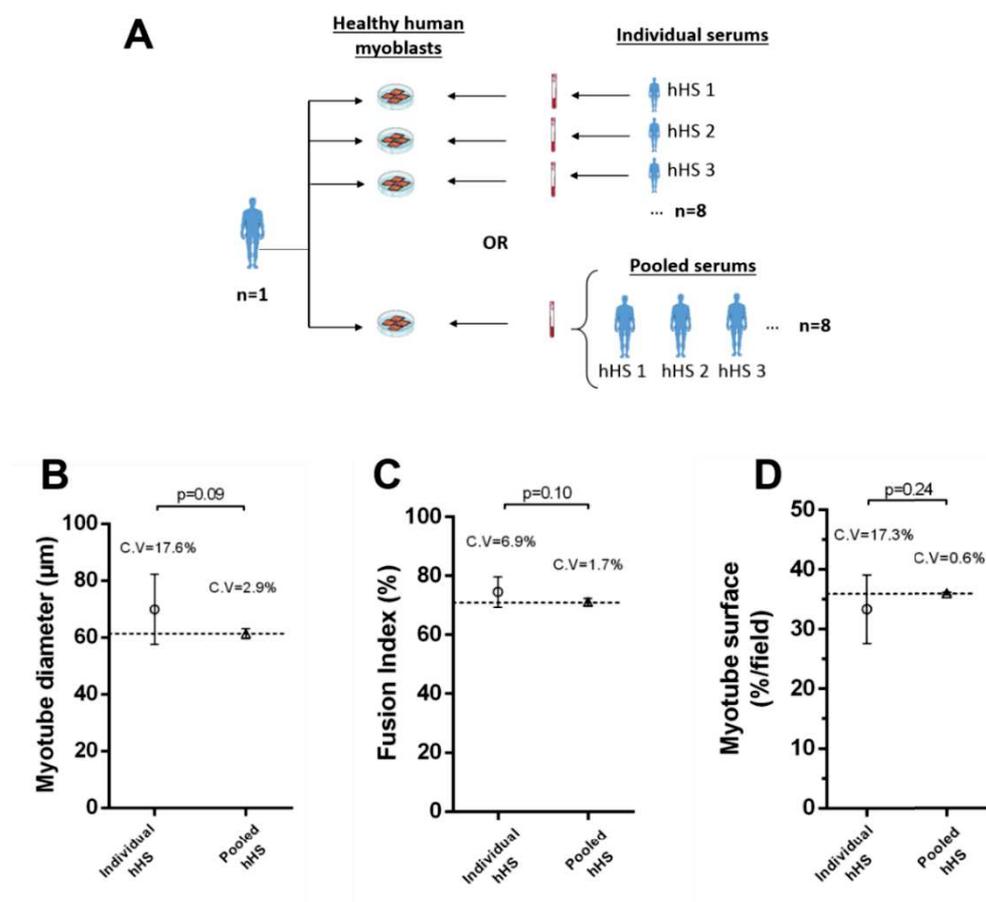


Fig 4. Effects of individual or pooled hHS on the differentiation characteristics of human muscle cells. The experimental design is schematically presented in (A). (B) The myotube diameter, (C) fusion index and (D) myotube surface obtained after differentiation of myoblasts from a single healthy subject in a medium containing 2% of eight individual hHS (circle) or a pool of the same hHS in triplicate (triangle). Data are expressed in mean \pm SD and statistical significance was tested with a one-sample t-test inference.

Table 3. Comparison of the myotube characteristics obtained after differentiation with eight individual human serums or a pool of the same eight serums

	Individual hHS (n=8)	Pooled hHS (n=3)	p value
Myotube diameter (μm)	69.9 \pm 12.3	61.4 / 63.0 / 59.5	0.09
Fusion Index (%)	74.5 \pm 5.2	72.2 / 69.8 / 71.3	0.10
Myotube surface (%/field)	33.3 \pm 5.8	36.2 / 35.9 / 35.8	0.24

As the pooled serums retained biological effects similar to those of individual serums, we then compared the differentiation characteristics of human myoblast cultures exposed to pooled hHS or FBS (experimental design in Fig 5A). Distribution frequency analysis of the myotube diameters showed that the pooled hHS, compared to FBS, induced a shift toward higher myotube diameters (Fig 5B), similar to that observed with individual hHS in Figure 2E. Furthermore, the cumulative frequency curves indicated a significant difference between hHS and FBS ($p < 0.0001$), with 50% of the myotubes differentiated in FBS measuring less than 39.8 μm against 57.2 μm in hHS (Fig 5C). It is interesting to note that horse serum, a commonly used serum for the differentiation of human myoblasts^{124,410}, has similar beneficial effects than pooled hHS on the differentiation characteristics of healthy myotubes such as myotube diameter, fusion index and surface covered by myotubes (S3 Fig).

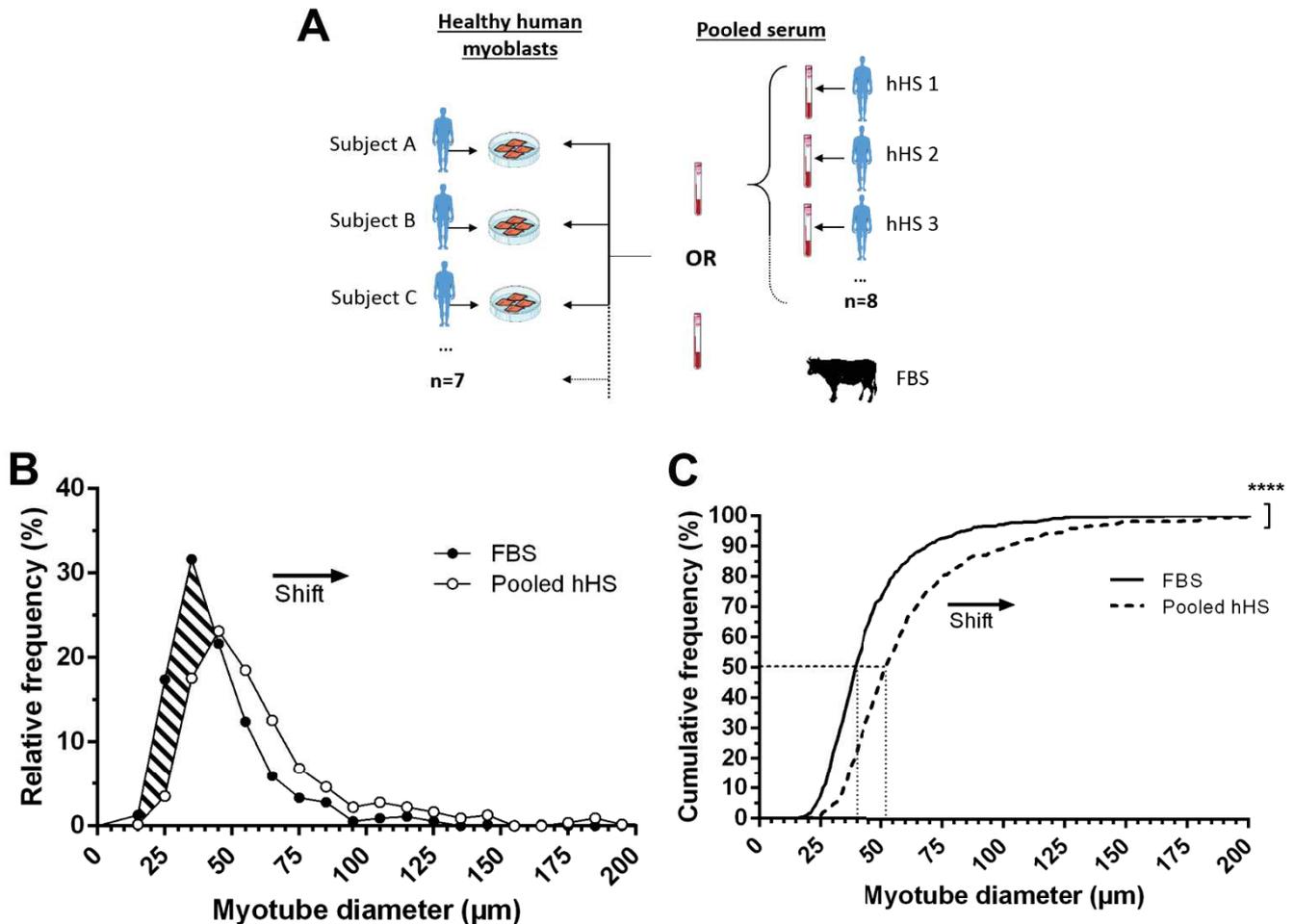


Fig 5. Effects of pooled hHS compared to FBS on the diameter of human myotubes. The experimental design is schematically presented in (A). (B) Distribution frequency and (C) cumulative frequency analysis of myotube diameters obtained after differentiation of myoblasts from a single healthy subject in 2% FBS or a pool of serums from eight healthy subjects. Data are expressed in percentage of all myotube diameters per condition and (****) indicates statistical significance at $p < 0.0001$ with Kolmogorov-Smirnov's distribution test.

While pooled hHS have a trophic effect on healthy human myotubes compared to FBS, we have shown that pooled hHS, compared to FBS, do not modify the viability and the proliferation rate of cultured healthy human myoblasts in absence or in presence of Ultrosor G (S4 Fig). It can be noted that Ultrosor G, a concentrated serum substitute routinely used for the proliferation of primary human myoblasts, improved the viability of the myoblasts while it decreased the doubling time to values similar to the ones we have previously observed for human myoblasts ⁴⁰⁹.

Sensitivity of healthy human myoblasts to serum from COPD patients

To assess the sensitivity of healthy human muscle cells to pathological serum, we compared the effects of pooled serums from COPD patients to those from healthy subjects on their differentiation characteristics. The subject characteristics are described in Table 4. We thus induced the differentiation of myoblasts from seven healthy subjects with pooled serums from eight healthy subjects or eight COPD patients (experimental design in Fig 6A). After 5 days of myogenic differentiation, we compared the morphological parameters between the myotubes exposed to hHS serums and COPD serums. Representative images of the cultured myotubes are shown in Figure 6B. While no difference was detected for the fusion index (60.5 ± 10.3 vs $59.7 \pm 10.9\%$, $p=0.60$; Fig 6C), we observed a significant decrease in the surface covered by the myotubes exposed to the COPD serums (36.0 ± 4.3 vs $33.0 \pm 3.9\%$, $p<0.05$; Fig 6D). Concomitantly, the COPD serums tended to reduce the myotube diameter (53 ± 14 vs $49 \pm 12 \mu\text{m}$, $p=0.09$; Fig 6E). A linear mixed model also indicated this tendency, with a significant reduction in the mean myotube diameter ($p<0.01$; S5 Fig). Distribution frequency analysis of the myotube diameters showed that the COPD serums induced a shift toward thinner myotubes compared to hHS (Fig 6F). In addition, cumulative frequency analysis showed a significant difference in the myotube diameter distribution ($p<0.001$), with 50% of the myotubes differentiated in COPD serums being 8% thinner than those in hHS (40.5 vs $43.8 \mu\text{m}$, Fig 6G).

Table 4. Characteristics of the healthy subjects and COPD patients

Characteristics	Healthy subjects	COPD patients	p value
	n=8	n=8	
Sex ratio (m/f)	6/2	4/4	-
Age (y)	60.9 ± 4.4	63.4 ± 6.5	0.522
FEV₁ (L)	$3.39 \pm 0.69^*$	1.29 ± 0.65	0.0013
(%pred)	106.2 ± 13.5	48.6 ± 21.7	
mMRC	-	2.1 ± 1.1	-
6-MWD (m)	717 ± 44	$518 \pm 154^\dagger$	0.013
(%pred)	103 ± 5	81 ± 25	
BMI (kg/m ²)	24 ± 3	25 ± 3	0.682

FEV₁ : Forced Expiratory Volume in one second. mMRC : modified Medical Research Council.

6-MWD : 6-Minute Walk Distance. BMI : Body Mass Index. Pred : Predictive value.

*: 2 missing values

†: 1 missing value

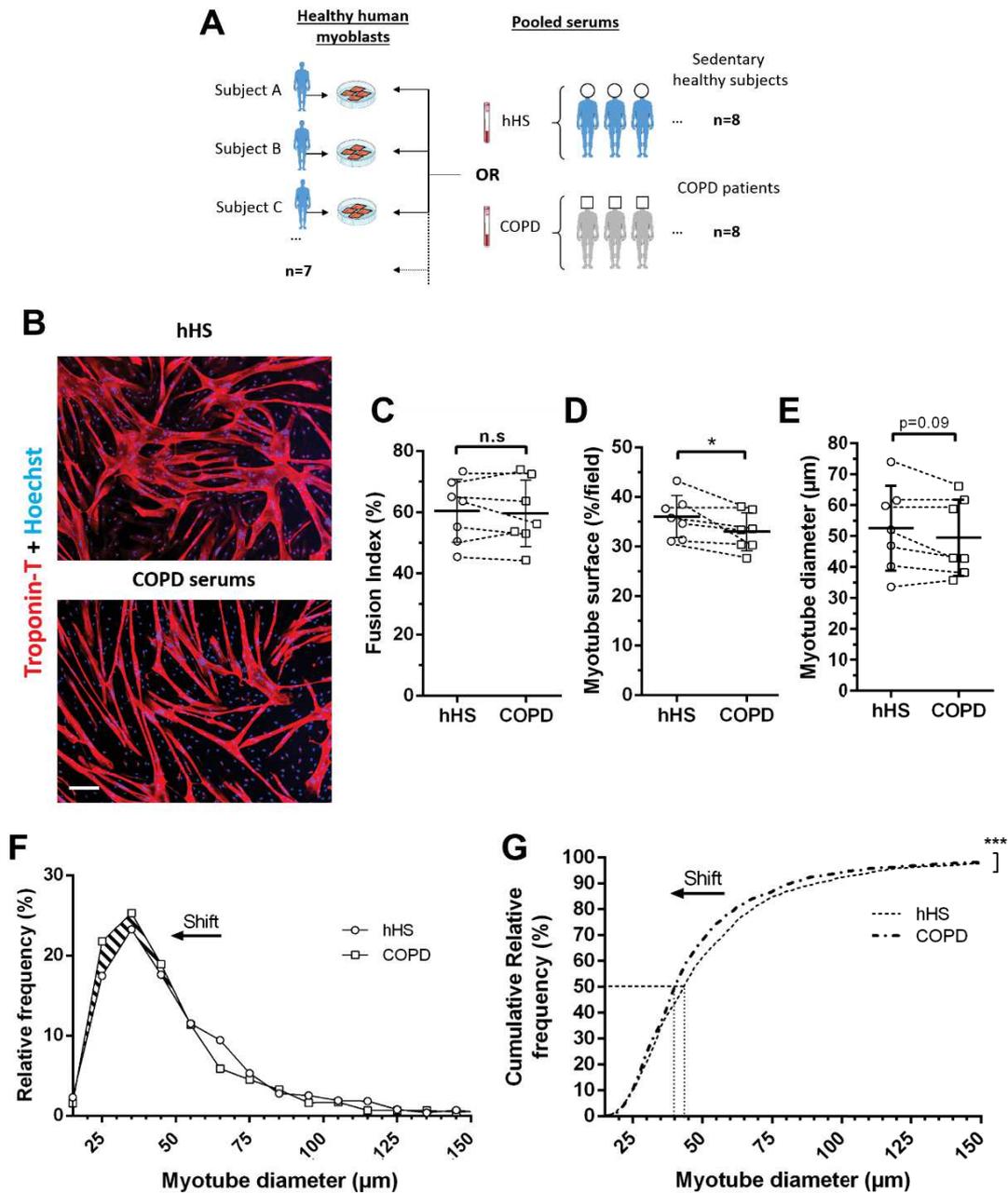


Fig 6. Effects of pooled COPD serums compared to pooled hHS on the differentiation characteristics of healthy human muscle cells. The experimental design is schematically presented in (A). (B) Representative pictures of the same myoblast culture differentiated in pooled hHS (up) or COPD serums (down). Morphology of the myotubes was observed with fluorescent microscopy using anti-troponin-T (red) and Hoechst (blue) staining. (C) The fusion index, (D) myotube surface and (E) myotube diameter were quantified from cultures of myoblasts from seven different healthy subjects differentiated in medium containing 2% of pooled hHS (circle) or pooled COPD serums (square). Data are expressed in mean \pm SD and (*) indicates statistical significance at $p < 0.05$ with a Student's t-test. Bar = 200 μ m. (F) Distribution frequency and (G) cumulative frequency analysis of myotube diameters. Data are expressed as percentage of all myotube diameters per condition and (***) indicates statistical significance at $p < 0.001$ with Kolmogorov-Smirnov's distribution test.

Discussion

In the present study, we investigated experimental variability related to the use of various myoblast cultures and serums from different subjects. We provide experimental evidence that individual serums from human subjects are able to induce the myogenic differentiation of human myoblasts (Figs 1, 2). Although we observed a potential trophic effect of the human serum, the variability of the differentiation response of the human myoblast cultures exposed to a single human serum was not affected compared to FBS (Fig 2). Furthermore, exposing human myoblasts to a pool of human serums instead of individual serums reduced the variability of the myogenic response without modifying the differentiation process (Figs 4, 5). Last, by showing that the myotubes differentiated in presence of COPD serums led to thinner myotubes than those differentiated in healthy serums, we validated the sensitivity of our *in vitro* model for studying the role of the microenvironment in human muscle atrophy (Fig 6).

The *in vitro* muscle cell culture is a powerful tool for studying isolated cellular processes, such as the maintenance of quiescence⁴²⁵, the switch from proliferation to differentiation⁴²⁶, and myogenic fusion⁴²⁷. Yet, the use of animal cell lines raises questions about their relevance for studying human muscle diseases. Therefore, defining the right parameters for human muscle cultures is required to achieve an optimal model of *in vivo* microenvironment conditions. Given the heterogeneity of cell culture conditions^{403–405,409,410,420}, we sought to define experimental procedures for culturing human muscle cells to ensure the reproducibility of measurements by our group and other teams. We found that 5,000 cells/cm² provided the highest number of myotubes, with a limited number of cell detachments (Table 1). Under these conditions, the fusion index and the myotube surface/diameter values were in the range of those described by others^{403,405,420,428}.

In 2000, Lawson and Purslow showed the variability in the differentiation response of mouse C2C12, rat L6 and chicken cell lines exposed to similar differentiation media⁴⁰⁶. The authors were surprised to observe that “these model systems respond quite differently to experimental conditions” and suggested “careful consideration in testing any model system.” As our primary human myoblasts were isolated from different healthy subjects, we investigated the intrinsic variability of each culture. In these experiments, no significant difference in the C.Vs of the myogenic indicators suggested that human serum, compared to FBS, was able to preserve the variability of the response of each myoblast culture (Fig 2B-D). However, although variability was preserved, the human serum seemed to modify

the differentiation dynamics (Fig 2B), inducing the morphological modifications of increased myotube surface (Fig 2C) and diameter (Fig 2D).

These observations prompted us to compare myotube distribution under FBS and hHS conditions, notably by gathering myotubes depending on their diameter. To carry out this nested experimental design, a linear mixed model was chosen as suitably adapted to take into account the value dependency related to repetitive observations (myotube diameter) performed within the same experimental object (myotubes from the same subject) (S2 Fig) ^{421,429}. This approach confirmed the tendency of human serum to increase myotube diameter, particularly by reducing the proportion of thin myotubes in favor of large ones (Fig 2E-F). Distribution profile analysis is not widely used in the field of *in vitro* muscle differentiation, but it provides a finer analytic tool to investigate the effect of molecules/microenvironment on muscle cell differentiation. Here, it showed the trophic effect of the human microenvironment, compared with FBS, on human myotube differentiation.

Several groups have investigated the importance of the origin of the serum in *in vitro* cultures, specifically for characterizing the culture parameters in order to avoid as many confounding variables as possible ⁴⁰⁸. Recently, it was shown that the industrial serums commonly used for *in vitro* muscle cultures (FBS, calf serum, horse serum) condition such cellular processes as proliferation, differentiation, fusion, quiescence, protein synthesis and even the insulin pathway ⁴³⁰. In the present study, we confirmed that serums from different healthy subjects, compared to FBS, are able to modify myogenesis by increasing the myotube diameter, fusion index and surface covered by myotubes (Fig 3).

We assessed the effects of single human serums on the differentiation process of myoblasts. However, to better approximate a representative serum composition for a global population and to take into account the difficulties of working with human tissue resources, we adapted our procedure by pooling different human serums, as previously described in the field ^{399,404,405}. This enabled us to optimize the volume of serum used for each experiment and reduce the serum-dependent variability without modifying the biological effects (Fig 4). Similar to the results obtained with a single human serum (Fig 2), the trophic effect of pooled human serums on differentiation was confirmed, compared to FBS (Fig 5). Interestingly, horse serum has similar trophic effects on healthy muscle cells than pooled hHS (S3 Fig), that could be explained by the reduced amount of growth factors in adult serum allowing for better myogenic differentiation.

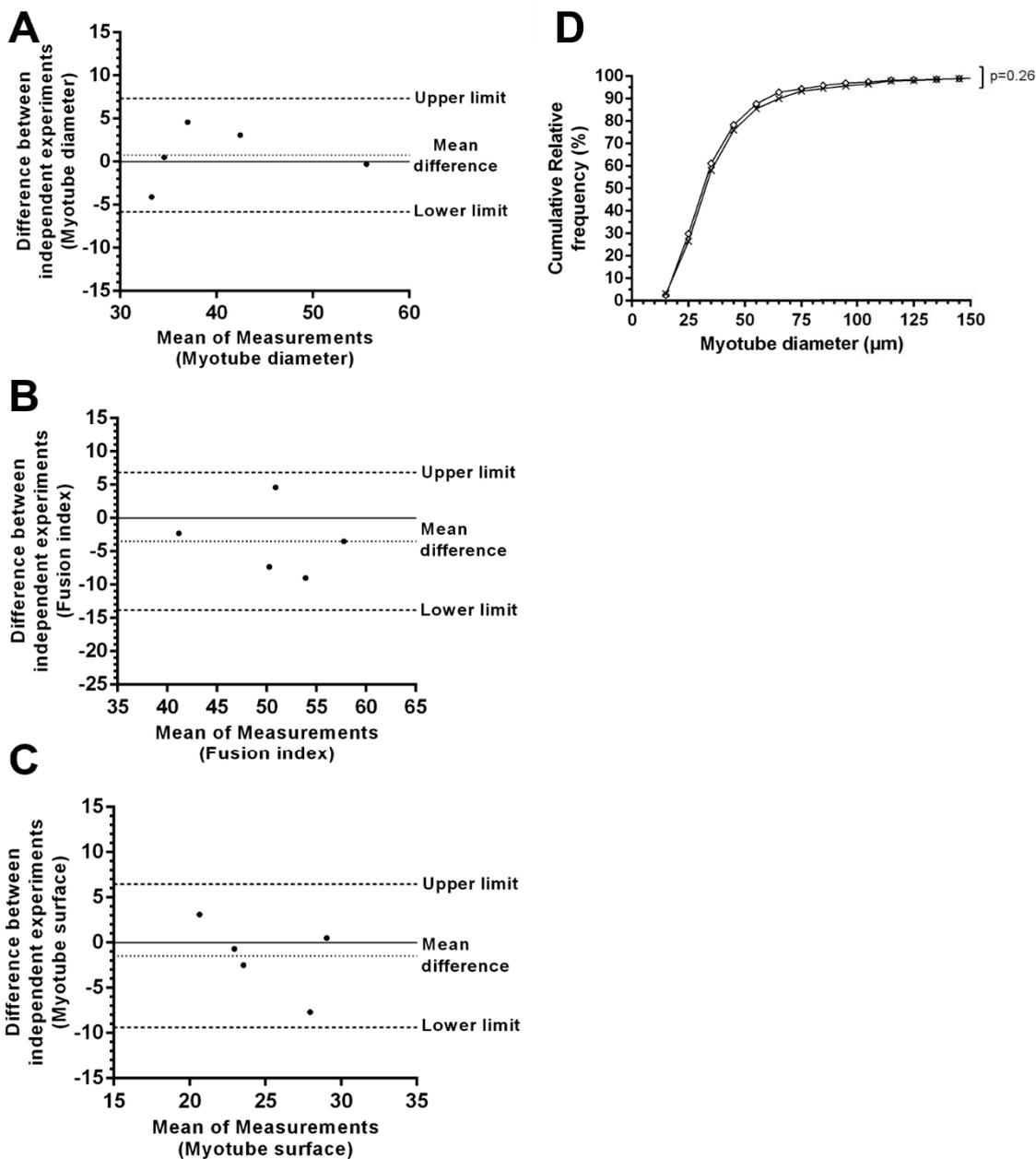
The composition of the microenvironment regulates many physiological processes, and its implication in the modulation of muscle atrophy in chronic disease/aging is a complex issue that is still debated. Since McKay's experiments and more recently with the works from Conboy and colleagues, it appears that aging imposes several changes on the circulating microenvironment, impacting processes such as neurogenesis, hepatogenesis and muscle regeneration⁴³¹. More specifically in COPD, Barnes and Celli hypothesized that the skeletal muscle atrophy occurring in COPD patients is partly due to a deleterious systemic microenvironment coming from the "spill-over" of inflammatory molecules from the lungs into the blood circulation⁴³². In the present study, we offer new experimental clues about this process. Although the COPD severity of the patients was moderate, our new methodology was sensitive enough to reveal that the composition of the COPD serums had deleterious effects on healthy myotubes (Fig 6). Furthermore, using a method of fiber size classification similar to that of Hernández and colleagues⁴³³, we confirmed the atrophic effect of the COPD serum and its ability to induce a higher proportion of thin myotubes to the detriment of intermediate and large myotubes (Fig 6). This atrophic effect might be driven by systemic inflammatory molecules, as suggested by the "spill-over" theory. Indeed, studies have shown a sustained increase in inflammatory cells and molecules and/or an altered repair system in the blood of COPD patients⁴³⁴⁻⁴³⁶, correlating with sarcopenia⁴³⁷. Furthermore, inhibition of neutrophilic inflammation by the phosphodiesterase-4 inhibitor, roflumilast, reduced muscle atrophy in *in vitro* COPD myotubes⁴¹⁰. Unfortunately, without the dosage of inflammatory molecules, we cannot definitively conclude on the inflammatory state of the COPD serums used in our study. Doing so was beyond the scope of this study and further experiments are now needed to better determine the composition of our COPD microenvironment.

The *in vitro* methodology described here enabled us to study the effects of a homologous microenvironment on the differentiation process of human muscle cells. We highlighted the importance of assessing both cell- and serum-variability, which is a crucial prerequisite for *in vitro* experiments with human tissues. Furthermore, to optimize the experiments, we showed that pooled human serums retain the biological effect of individual serums. Last, we validated our methodology by providing experimental clues of the "spill-over" mechanism by which deleterious molecules from the lung may contribute to the skeletal muscle atrophy occurring in COPD patients.

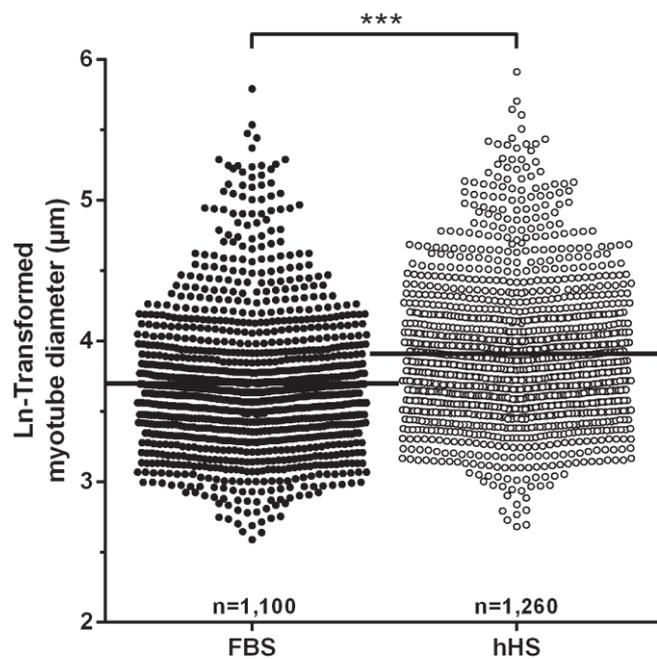
Acknowledgements

We gratefully acknowledge the Fontalvie/5-Santé Group (Osséja, France) and the research group of JP Cristol (PhyMedExp, Montpellier, France) for their support in obtaining human samples, which was a crucial contribution to our studies. We would also like to acknowledge C Stott for critical reading of the manuscript.

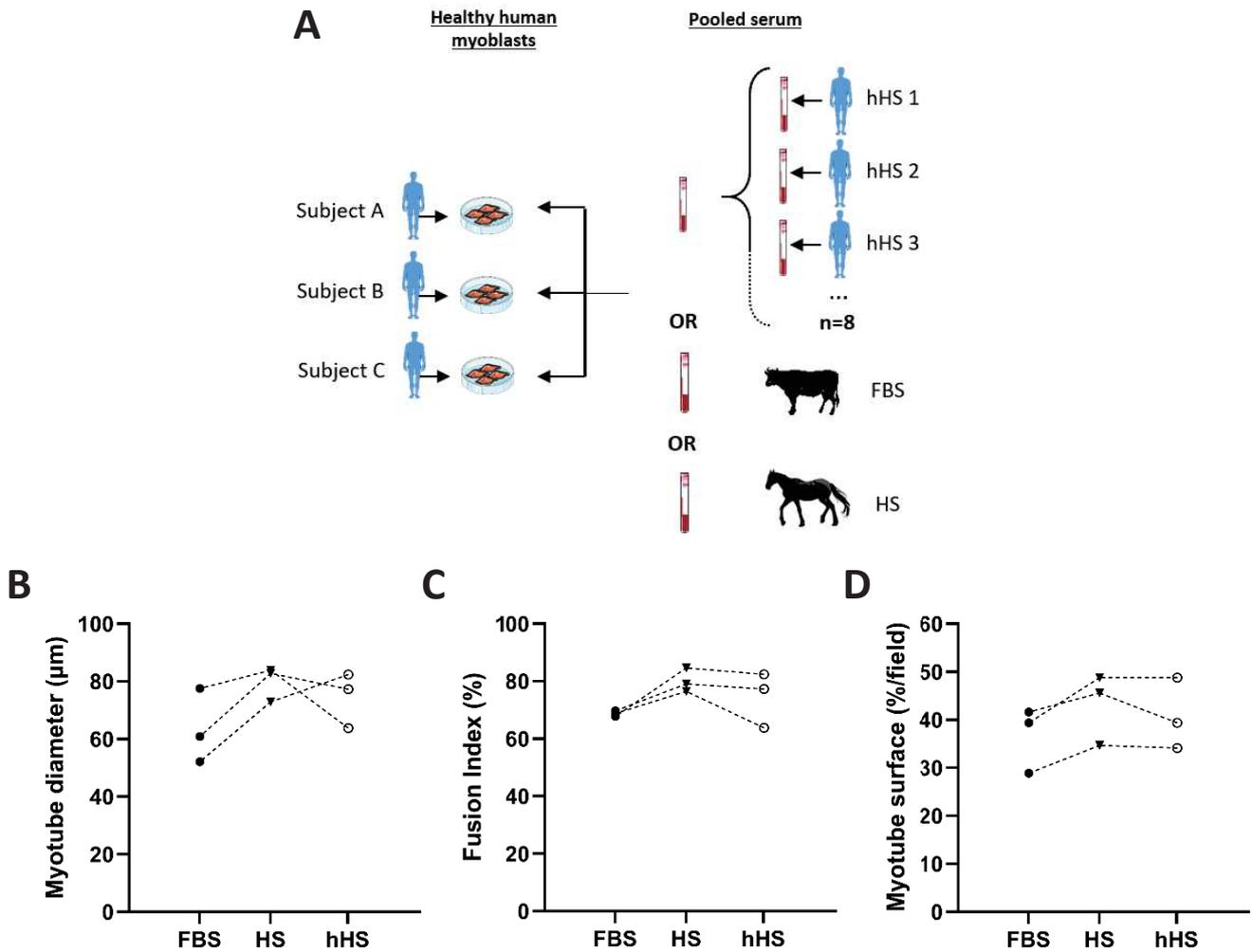
Supporting Information



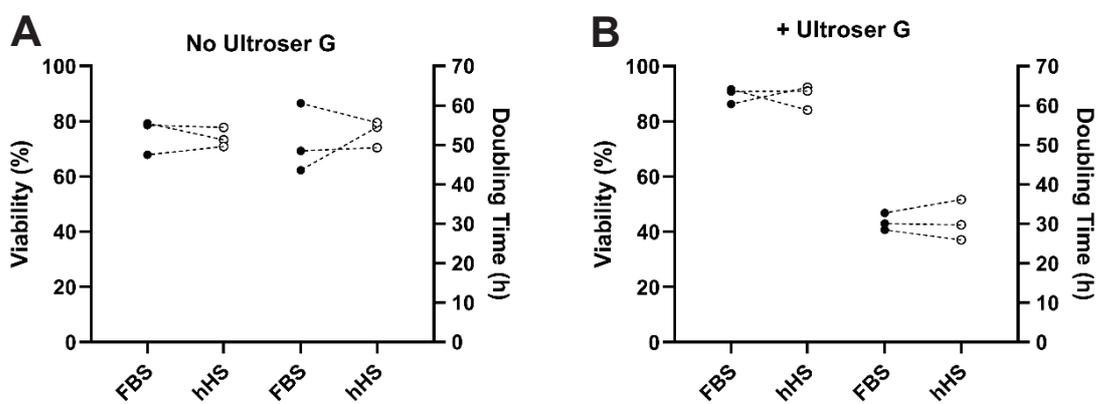
S1 Fig. Measurement reproducibility for the myotube diameter, fusion index and myotube surface between two independent experiments. Bland-Altman plot of (A) the myotube diameter, (B) fusion index and (C) surface covered by myotube measurements from two independent experiments. The myotube diameter, fusion index and myotube surface were quantified from muscle cell cultures from five different healthy subjects differentiated in medium containing 2% of FBS (dotted lines indicate upper and lower limits of agreement). (D) Cumulative relative frequency analysis of the myotube diameter distribution from the same independent experiments. Statistical significance was assessed with Kolmogorov-Smirnov's distribution test.



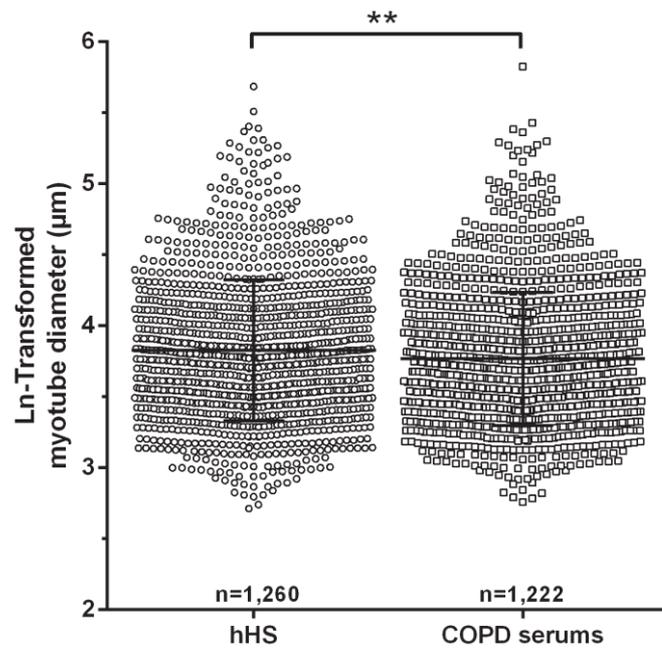
S2 Fig. Effects of an individual hHS compared to FBS on the diameter of healthy myotubes analyzed with a linear mixed model. The diameter of myotubes obtained after differentiation of myoblasts from seven healthy subjects in medium containing 2% of FBS (closed circles) or a single hHS (opened circles). Diameter values were Ln-transformed and expressed as mean and (***) indicates statistical significance at $p < 0.001$ with a linear mixed model.



S3 Fig. Comparison of horse serum (HS) with FBS and pooled hHS on the differentiation characteristics of human muscle cells. The experimental design is schematically presented in (A). Quantification of the (B) myotube diameter, (C) fusion index and (D) myotube surface analysis of muscle cells from three different healthy subjects differentiated in medium containing 2% FBS, horse serum (HS) or a pool of serums from eight healthy subjects (hHS). Dotted lines link muscle cell cultures from the same subject.



S4 Fig. Effects of pooled hHS compared to FBS on the viability and doubling time of healthy myoblasts. The percentage of viability and the doubling time were quantified from cultures of myoblasts from three healthy subjects. Cells were grown in DMEM supplemented with 20% FBS or a pool of serums from eight healthy subjects (hHS) in absence (A) or in presence (B) of Ultrosor G (dotted lines link muscle cell cultures from the same subject).



S5 Fig. Effects of pooled COPD serums compared to pooled hHS on the diameter of healthy myotubes analyzed with a linear mixed model. The diameter of myotubes obtained after differentiation of myoblasts from seven SHS in medium containing 2% of pooled hHS (circle) or pooled COPD serums (square). Diameter values were Ln-transformed and expressed as mean±SD and (**) indicates statistical significance at $p < 0.01$ with a linear mixed model.

**Etude 3 : Effets du microenvironnement BPCO en fonction de la sévérité
de la maladie sur la différenciation des myoblastes humains sains**

I. Introduction :

La dysfonction musculaire dans la BPCO est une comorbidité complexe touchant environ un tiers des patients⁶³ et pour laquelle il n'existe, en 2019, toujours pas de solution curative⁶⁵. Cette atteinte périphérique de l'organisme n'est pas « simplement » une baisse des capacités fonctionnelles musculaires relative au vieillissement (sarcopénie), mais c'est une réelle atteinte musculaire handicapante résultant d'un vieillissement accéléré de l'organisme^{63,64}, et qui est associée à un mauvais facteur pronostic de survie^{72,74}. La sarcopénie, à l'image d'autres comorbidités d'origine cardio-vasculaire ou métabolique^{438,439}, semble intimement liée à l'apparition d'un état inflammatoire systémique et d'une réduction généralisée des défenses anti-oxydantes, principales répercussions systémiques induisant un déclin de la communication inter-organe *via* la circulation sanguine^{63,64,440}.

L'hypothèse de l'implication de la circulation systémique comme médiatrice de l'atteinte musculaire dans la BPCO a clairement été formulée en 2009⁵⁸ et semble être appuyée par de récentes études menées chez l'animal et l'homme. En effet, une étude a montré des altérations des processus de dégradation/synthèse protéique musculaire entraînant un défaut de régénération associée à des dysfonctions musculaires chez des souris « emphysémateuses » présentant une inflammation pulmonaire après exposition à des lipopolysaccharides bactériens (LPS)²⁸³. Ces résultats font écho à des travaux de la même équipe, montrant que des patients BPCO présentent des altérations similaires de l'homéostasie protéique et que ces défauts sont d'autant plus prononcés que les patients sont sarcopéniques¹²². Dans cette étude, les auteurs suggèrent finalement que le stress oxydant et l'inflammation systémique, deux processus particulièrement dérégulés chez les patients BPCO, pourraient être à l'origine de remodelages musculaires précurseurs à un épuisement progressif du potentiel de régénération myogénique.

Cette hypothèse soulève indirectement l'idée que dans la BPCO la circulation systémique, par l'apport chronique de facteurs inflammatoires et du stress oxydant²¹², participe à la détérioration locale du microenvironnement de la cellule satellite qui représente l'ensemble des signaux extrinsèques de l'environnement. Ceci suggère également que les phases d'exacerbation qui modifieraient encore plus amplement le microenvironnement de la cellule satellite, pourraient grandement participer au déclin de la fonction musculaire, et pas uniquement par le biais d'une réduction de l'activité physique^{299,441,442}. Il est donc possible que ce microenvironnement délétère pour la cellule satellite puisse abolir l'alternance des phases pro- et anti-inflammatoires nécessaires à la

régénération musculaire, tout en modifiant la régulation des processus de différenciation musculaire^{212–214}.

Cependant, l'implication du microenvironnement dans l'altération des processus de différenciation chez le patient BPCO est encore peu explorée. Ceci est notamment dû à la difficulté d'étudier ces interactions *in vivo*, ce que l'approche *in vitro* par la culture de myoblastes/myotubes a grandement simplifiée. Dans cette troisième étude, nous nous sommes ainsi intéressés à l'impact du microenvironnement musculaire de patients BPCO selon la sévérité de leur maladie, sur la différenciation de myoblastes humains sains. L'hypothèse était que les facteurs circulants ont des effets délétères sur la différenciation des myoblastes et qu'il existe une gradation en fonction de la sévérité de la maladie et de la toxicité de ce microenvironnement.

II. Procédure expérimentale :

A partir de la méthodologie mise en place dans l'étude 2, nous avons cultivé des myoblastes provenant de 6 sujets sains (caractéristiques dans le tableau 1), isolés à partir d'une biopsie du *vastus lateralis*, dans un milieu de prolifération (DMEM / 20% SVF / 0,5% Ultrosor G – voir fiche technique n°7 « Culture primaire de myoblastes humains »). Nous avons ensuite induit leur différenciation en exposant les cultures à un milieu de différenciation composé de 2% de sérum de sujets sains ou de patients BPCO (voir schéma expérimental ci-après).

Tableau 1 : Caractéristiques des sujets sains dont sont issues les cellules

	Sujets sains (n=6)
Age (années)	60,2±5,5
IMC (kg/m ²)	25,0±3,5
IMM (kg/m ²)	19,4±2,1
FMVq (kg)	31,2±6,3*
VEMS (L)	3,45±0,61
(%préd)	103,0±13,8
TDM6 (m)	625±31,6
(%préd)	88,0±9,7

IMC : Indice de masse corporelle,

IMM : Indice de masse maigre,

FMVq : Force maximale volontaire du quadriceps,

VEMS : Volume expiré maximal en 1 seconde,

TDM6 : Test de marche de 6 minutes

* une donnée manquante

Le sérum utilisé dans chaque condition correspond à un mélange d'échantillons sériques provenant de 8 sujets pour chacun des 4 sous-groupes suivants :

- Séra de sujet sains (SHS) ;
- Séra de patients BPCO GOLD 0-I (G0-I) ;
- Séra de patients BPCO GOLD II-III (GII-III) ;
- Séra de patients BPCO GOLD IV (GIV).

A l'issue des 5 jours de différenciation, les myotubes sont fixés afin d'être imagés par microscopie à fluorescence selon la procédure décrite par la fiche technique n°7 « Immunofluorescence des myotubes et analyses de la morphologie cellulaire ». Trois paramètres morphologiques cellulaires sont évalués (le diamètre des myotubes, l'index de fusion [IdF] et la surface recouverte par les myotubes) afin d'évaluer les effets trophiques de chaque microenvironnement.

D'autre part, les ARN et protéines sont extraits selon les procédures décrites dans la fiche technique n°8 « Extraction et purification des protéines et ARN totaux », afin d'analyser l'expression des différents marqueurs par qPCR et *Western Blot*, respectivement. L'ensemble des procédures relatives à ces deux méthodes, aux séquences d'amorces et aux anticorps utilisés sont décrites dans les fiches techniques n°9 « RT-qPCR » et n°10 « SDS-PAGE et *Western Blot* ».

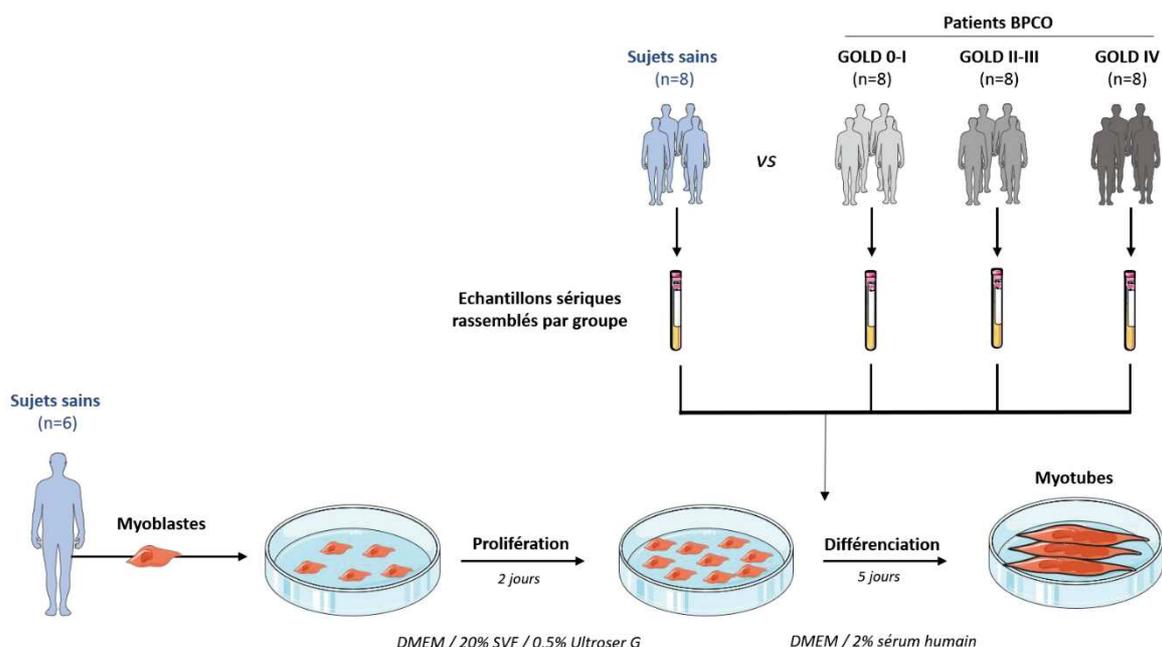


Schéma expérimental de l'étude 3

III. Résultats :

Caractéristiques basales des patients BPCO :

Les caractéristiques basales de chaque sous-groupe de sujets sont décrites en fonction de la sévérité dans le tableau 2. L'ensemble des patients comprend 67% d'hommes, un âge moyen de 64 ans et un VEMS moyen de 57% de la valeur prédite. On constate que l'IMC moyen est préservé (26,6 kg/m²) tandis que la tolérance à l'effort est réduite avec une distance moyenne au TDM6 de 71% de la valeur prédite.

Tableau 2 : Caractéristiques des sujets sains et patients BPCO dont sont issus les sérums

	Sujets sains (n=8)	Patients BPCO (n=8/groupe)			Toutes sévérités	Significativité
		<i>GOLD 0-I</i>	<i>GOLD II-III</i>	<i>GOLD IV</i>		
Age (années)	61,8±4,0	64,6±7,8	65,0±5,1	62,0±3,4	63,9±5,6	0,81
Sexe (H/F)	5/3	6/2	5/3	5/3	16/8	-
IMC (kg/m²)	24,5±3,7	28,6±5,5	27,8±8,3	23,5±2,9	26,6±6,2	0,21
VEMS (L)	3,16±0,66	2,53±0,50	1,47±0,57	0,62±0,14	1,48±0,84	<0,0001
(%_{préd})	107,0±14,5	89,8±12,5	57,0±17,8	24,0±4,0	56,9±30	
TDM6 (m)	-	582±140	424±84	340±54	449±140	<0,0001
(%)	-	93±15	68±14	53±9	71±21	

IMC : Indice de masse corporelle, VEMS : Volume expiré maximal en 1 seconde, TDM6 : Test de marche de 6 minutes, %_{préd} : pourcentage de la valeur prédite

Le sérum des patients légers altère le diamètre des myotubes contrairement aux séras des patients plus sévères :

L'analyse morphologique des myotubes ne montre aucune différence significative sur chacun des paramètres mesurés (diamètre moyen, IdF, surface recouverte par les myotubes) entre toutes les conditions de différenciation (Fig.1). On distingue cependant que par rapport aux myotubes exposés à du sérum sain, le diamètre des myotubes exposés à du sérum de patients BPCO présente un profil « en marche d'escalier » (Fig.1A). D'une part, alors que les myotubes exposés à un microenvironnement SHS ont un diamètre moyen de 42,4±9,3 µm, les myotubes exposés à du sérum de patients G0-I ont un diamètre moyen de 39,9±9,1 µm (-6,1%), ce qui est en accord avec les résultats présentés dans l'étude 2, puisque la sévérité des patients du groupe G0-I est comparable à celle des patients utilisés

dans l'étude 2. De plus, l'analyse en fréquence de distribution cumulée relative montre que le sérum des patients G0-I induit une diminution significative du diamètre vers des myotubes plus fins, avec une réduction de 5,0% du diamètre de la moitié des myotubes différenciés en sérum G0-I comparé au sérum SHS (35,4 vs 36,9 μm , $p = 0,013$; Fig.1D). D'autre part, les myotubes exposés à du sérum de patients GII-III et GIV ont respectivement un diamètre moyen de $43,7 \pm 9,5 \mu\text{m}$ (+3,3%) et $46,1 \pm 7,2 \mu\text{m}$ (+8,7%) (Fig.1A).

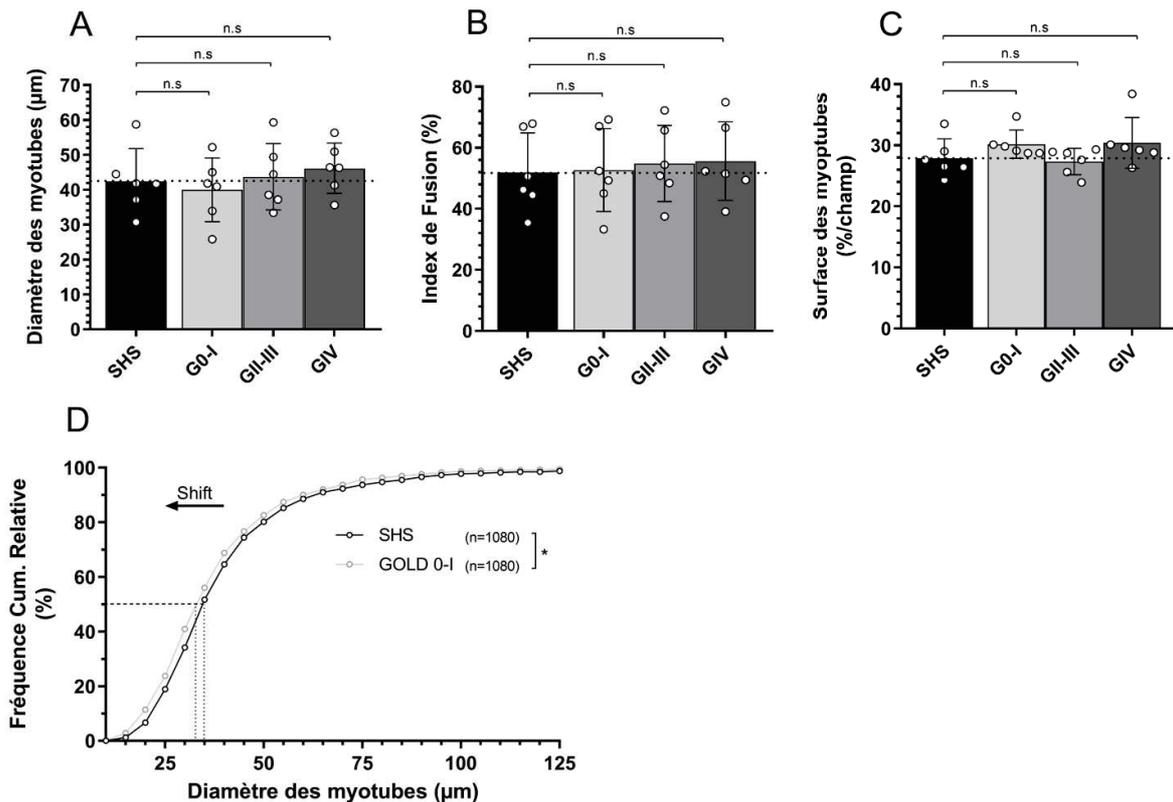


Figure 1 : Effets du sérum de patients BPCO GOLD 0-I, II-III ou IV comparés au sérum de sujets sains sur les caractéristiques morphologiques de différenciation des myotubes sains. Quantification du (A) diamètre des myotubes, (B) de l'index de fusion et (C) de la surface couverte par les myotubes de 6 sujets sains différenciés dans un milieu composé de 2% de sérum de sujets sains ou de patients BPCO GOLD 0-I, GOLD II-III ou GOLD IV (mélange d'échantillons de 8 sujets/groupe). Dans chaque condition, la moyenne et l'écart-type des données sont indiqués et la ligne en pointillée indique la moyenne pour les données relatives à la condition contrôle. L'ANOVA de Friedman n'indique aucune différence statistiquement significative. (D) Analyse en fréquence de distribution cumulée relative des diamètres de myotubes de 6 sujets sains différenciés dans un milieu composé de 2% de sérum de sujets sains ou de patients BPCO GOLD 0-I. Pour l'analyse en fréquence de distribution cumulée relative les données sont exprimées en pourcentage de l'ensemble des mesures de diamètre de myotubes par condition et (*) indique une différence significative à $p < 0,05$ au test de distribution de Kolmogorov-Smirnov.

On retrouve ce profil dans une moindre mesure sur l'analyse de l'IdF, où les myotubes exposés à du sérum de sujets sains ont un IdF de $51,9 \pm 13,0$ %, alors que les myotubes exposés à du sérum de patients G0-I, GII-III et GIV ont respectivement un IdF de $52,7 \pm 13,5$ %, $54,8 \pm 12,5$ % et $55,6 \pm 12,9$ % (Fig.1B). En revanche, l'analyse de la surface occupée par les myotubes ne montre pas les mêmes tendances puisque les cellules exposées à du sérum SHS et de patients GII-III occupent respectivement $27,9 \pm 3,2$ et $27,3 \pm 2,1$ % du champ, alors que les myotubes exposés aux sérum G0-I et GIV recouvrent $30,2 \pm 2,3$ et $30,4 \pm 4,1$ % du champ (Fig.1C).

La sévérité de la maladie n'affecte pas les effets du sérum de patients BPCO sur la transcription de MyoD et myogénine dans les myoblastes sains :

Nous avons évalué l'expression de MyoD et myogénine (MyoG) qui sont des marqueurs primordiaux de la différenciation des myoblastes. De manière similaire à l'analyse du diamètre des myotubes, l'expression de ces deux marqueurs présente un profil d'expression « en marche d'escalier » suivant la sévérité de la maladie. Bien qu'aucune différence d'expression ne soit observée, les myotubes exposés à du sérum de patient G0-I présentent une réduction de l'expression de MyoD de $15,8 \pm 30$ % par rapport à l'expression mesurée dans les myotubes différenciés avec du sérum SHS, alors que les myotubes exposés à du sérum GII-III et GIV présentent des augmentations de $5,0 \pm 19$ % et $13,9 \pm 21$ % de l'expression de MyoD (Fig.2A). Similairement, les myotubes exposés à du sérum de patient G0-I présentent une sous-expression de $4,6 \pm 30$ % de MyoG, alors que les myotubes exposés à du sérum de patients plus sévères présentent une surexpression de $7,6 \pm 11$ % (GII-III) et de $11,1 \pm 18$ % (GIV) de MyoG (Fig.2B).

Le sérum de patients GIV induit une surexpression de PGC1 α au cours de la différenciation :

De manière intéressante, similairement à MyoD et MyoG, l'expression de PGC1 α présente également un profil en « marche d'escalier », avec une tendance à être sous-exprimé ($-16,6 \pm 27$ %) dans les myotubes différenciés avec du sérum de patients G0-I, et à être surexprimé dans les myotubes exposés à du sérum de patients GII-III ($+27,7 \pm 36$ %). Le sérum des patients les plus sévères (GIV) entraîne, quant à lui, une surexpression significative de l'expression de PGC1 α ($+33,3 \pm 28$ %, $p=0,032$) (Fig.2C).

Etant donné le profil « en marche d'escalier » de l'expression de MyoD, MyoG et PGC1 α , nous avons analysé individuellement la relation potentielle entre l'expression de chacun de ces marqueurs et le diamètre des myotubes. Nous avons ainsi pu constater qu'il existe une corrélation significative entre le diamètre des myotubes et l'expression respective

de MyoD ($r^2=0,40$; $p<0,001$), MyoG ($r^2=0,52$; $p<0,05$) et PGC1 α ($r^2=0,67$; $p<0,001$) (Fig.2D-F). La régression linéaire multiple entre ces trois marqueurs montre également une très bonne interrelation entre l'expression de ces 3 marqueurs ($r^2=0.83$) (Fig.2G), suggérant un lien potentiel entre l'expression de PGC1 α et l'avancement de la différenciation.

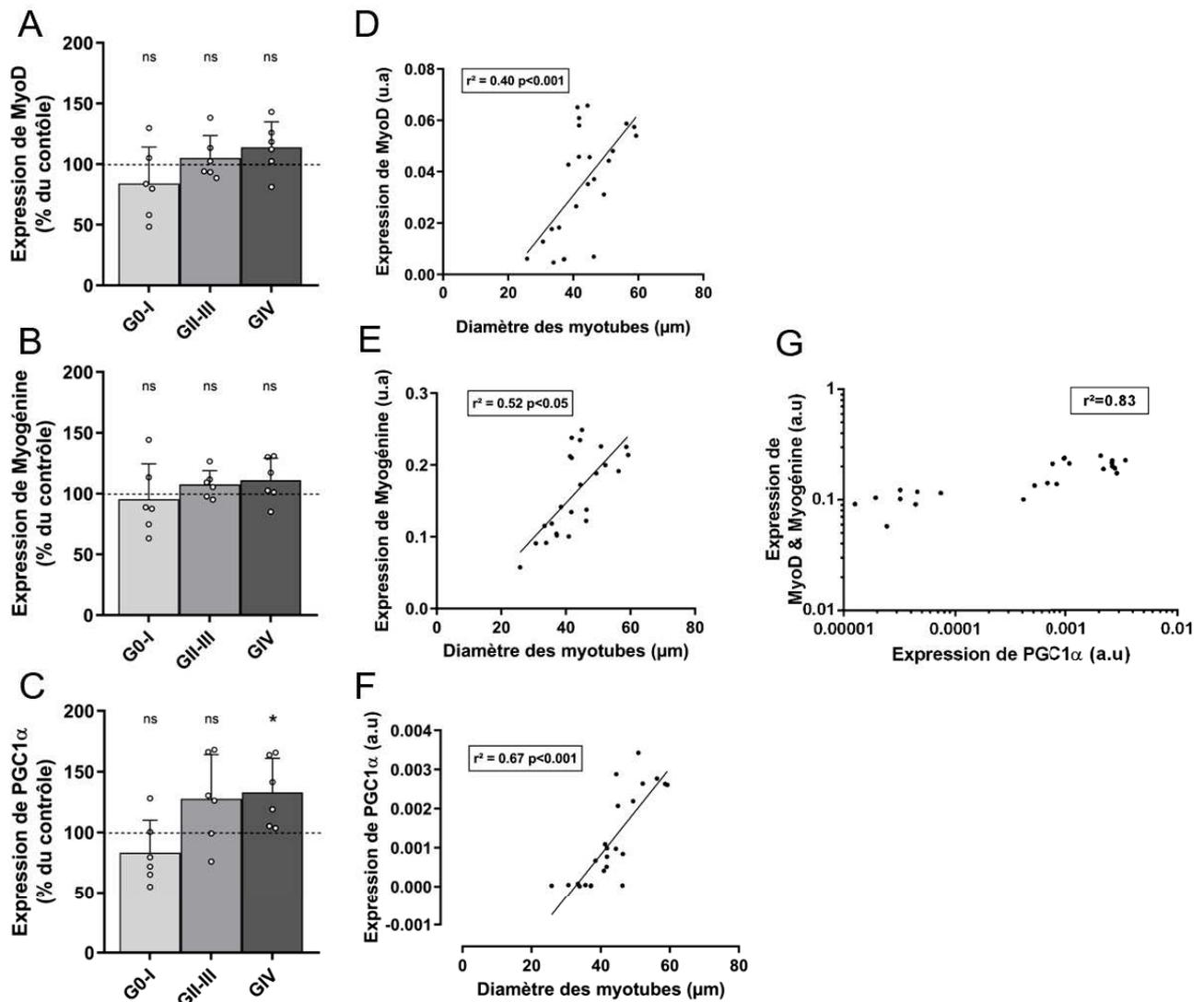


Figure 2 : Effets du sérum de patients BPCO GOLD 0-I, II-III ou IV sur l'expression de MyoD, MyoG et PGC1 α dans des myotubes sains. Quantification de l'expression de (A) MyoD, (B) MyoG et (C) PGC1 α dans les myotubes de 6 sujets sains différenciés dans un milieu composé de 2% de sérum de sujets sains ou de patients BPCO (8 sujets/groupe). L'analyse statistique montre une corrélation significative entre l'expression de (D) MyoD, (E) MyoG et (F) PGC1 α en fonction du diamètre de myotube, suggérant une interrelation entre chacun de ces marqueurs mise en évidence par la corrélation multiple entre MyoD, MyoG et PGC1 α (G). Dans chaque condition, les données sont normalisées et exprimées en pourcentage de l'expression mesurée dans les myotubes exposés à du sérum de sujets sains (ligne pointillée). (*) indique une différence significative à $p<0,05$ avec l'ANOVA de Friedman comparée à la condition contrôle.

Diminution d'expression de la myostatine dans les myotubes sains exposés à du sérum de patients BPCO :

En parallèle, nous nous sommes intéressés à l'expression d'un marqueur central de la régulation de la masse musculaire, la myostatine. Bien qu'aucune variation d'expression ne soit significative, on peut noter que le sérum de patients BPCO, indépendamment de la sévérité, induit une baisse d'environ 10% de l'expression de myostatine par rapport au sérum de sujets sains ($-8,5\pm 11\%$ pour le sérum G0-I, $-9,5\pm 11\%$ pour le sérum GII-III et $-10,7\pm 12\%$ pour le sérum GIV) (Fig.3).

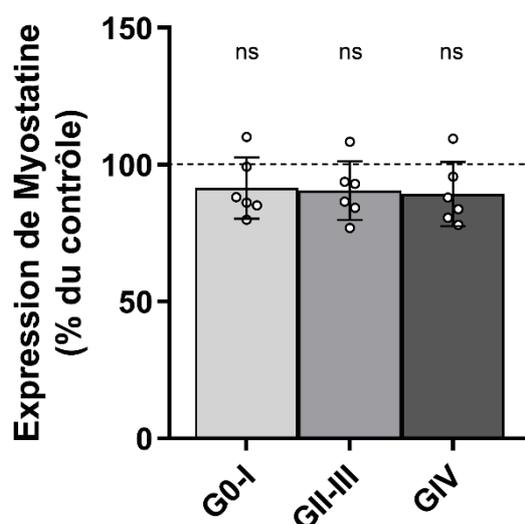


Figure 3 : Effets du sérum de patients BPCO GOLD 0-I, II-III ou IV sur l'expression de myostatine dans des myotubes sains. Quantification de l'expression de myostatine dans les myotubes de 6 sujets sains différenciés dans un milieu composé de 2% de sérum de sujets sains ou de patients BPCO (8 sujets/groupe). Dans chaque condition, les données sont normalisées et exprimées en pourcentage de l'expression mesurée dans les myotubes exposés à du sérum de sujets sains (ligne pointillée). L'ANOVA de Friedman n'indique aucune différence statistiquement significative.

Le sérum de patient BPCO ne modifie pas l'expression des enzymes MuRF1 et Atrogin-1 :

Afin d'évaluer l'implication des voies du catabolisme dans la régulation du diamètre des myotubes en culture, nous avons évalué le niveau d'expression des deux principales enzymes du système UPS : MuRF1 et Atrogin-1. Alors qu'aucune différence significative n'est observée entre les cellules exposées à du sérum sains ou de patients BPCO toutes sévérités confondues, l'expression de MuRF1 suit le même profil d'expression « en marche d'escalier » que MyoD, MyoG et PGC1 α . En effet, les myotubes exposés à du sérum de

patients G0-I montrent une réduction de la transcription de MuRF1 de $11,7 \pm 18\%$ par rapport à l'expression mesurée dans les myotubes exposés à du sérum sain, tandis que les myotubes exposés à du sérum de patients modérés et sévères présentent une augmentation de l'expression de MuRF1 respectivement de $6,6 \pm 15\%$ (GII-III) et de $30,0 \pm 31\%$ (GIV) (Fig.4A). Alors que l'expression d'Atrogin-1 ne montre aucune variation significative, on note malgré tout une hausse de son expression de $9,6\%$ dans les myotubes exposés au sérum des patients les plus légers (G0-I) (Fig.4B).

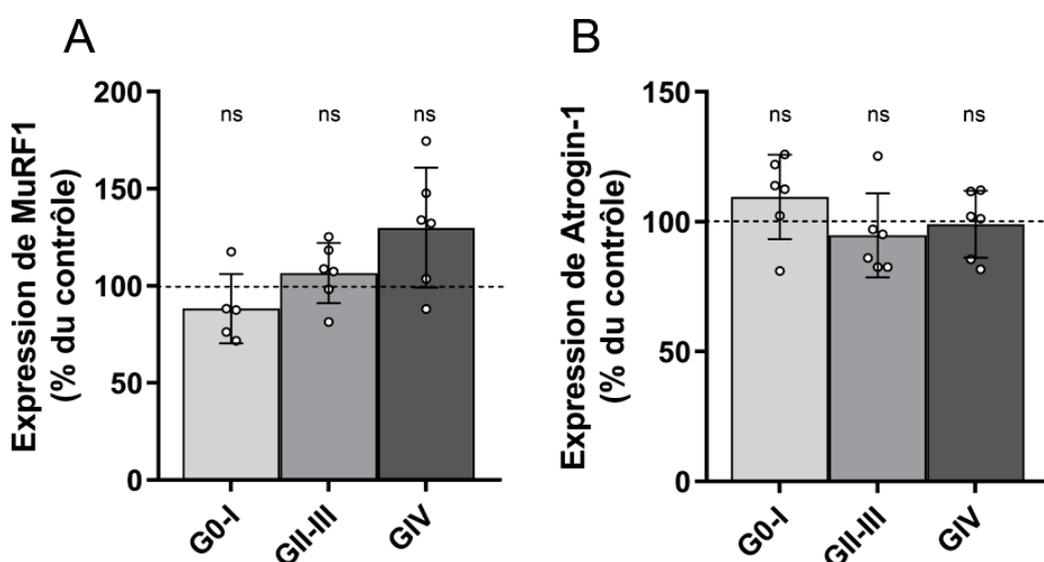


Figure 4 : Effets du sérum de patient BPCO GOLD 0-I, II-III ou IV sur l'expression de MuRF1 et Atrogin-1 dans des myotubes sains. Quantification de l'expression de (A) MuRF1 et (B) Atrogin-1 dans les myotubes de 6 sujets sains différenciés dans un milieu composé de 2% de sérum de sujets sains ou de patients BPCO (8 sujets/groupe). Dans chaque condition, les données sont normalisées et exprimées en pourcentage de l'expression mesurée dans les myotubes exposés à du sérum de sujets sains (ligne pointillée). L'ANOVA de Friedman n'indique aucune différence statistiquement significative.

IV. Discussion :

Bien que la plupart de nos analyses n'aient montré aucune différence significative, nos résultats semblent indiquer que la différenciation *in vitro* des myoblastes humains sains est affectée par le sérum de patients BPCO de manière graduelle selon la sévérité de la maladie. Similairement à l'étude 2, le sérum provenant des patients BPCO légers (G0-I) induit un phénomène d'atrophie des myotubes sains, alors que le sérum des patients les plus sévères (GIV) entraîne une augmentation du diamètre des myotubes (Fig.1). Ces effets opposés sur la morphologie des myotubes semblent être dépendants de l'expression de PGC1 α , MyoD et MyoG, de sorte que l'expression de ces marqueurs suit un profil en « marche d'escalier » et sont graduellement exprimés en fonction de la sévérité du sérum (Fig 2). Nous avons également observé que, quelle que soit la sévérité du sérum, la transcription de myostatine est réduite (Fig.3) et que l'expression de MuRF1 est graduellement surexprimée dans les myotubes exposés à du sérum de patients BPCO (Fig.4), suggérant une amplification progressive du caractère délétère du sérum de patients BPCO au cours de la progression de la maladie. L'ensemble des effets induits par les séra BPCO est résumé dans le tableau 3. Ces résultats suggèrent ainsi une évolution de la composition du microenvironnement des patients BPCO en fonction de la sévérité de la maladie, avec potentiellement la présence de facteurs pro-régénératifs en compensation de signaux délétères.

Tableau 3 : Comparaison des effets induits par les sérums de patients BPCO G0-I, GII-III et GIV sur les myotubes humains sains

	Patients BPCO		
	G0-I	GII-III	GIV
Morphologie Cellulaire			
Diamètre	↓	=	↑
Index de fusion	=	↑	↑
Surface couverte	↑	=	↑
Différenciation / Régénération			
MyoD	↓	↑	↑
MyoG	↓	↑	↑
PGC1 α	↓	↑	↑*
Dégradation Protéique			
Myostatine	↓	↓	↓
MuRF1	↓	↑	↑
Atrogin1	↑	↓	=

* : variation significative ; ↑ : augmentation ; ↓ diminution ; = aucune variation

Le sérum des patients BPCO les plus légers altère la différenciation des myoblastes sains :

Des études ont montré le potentiel délétère de facteurs circulants, notamment inflammatoires, sur l'atrophie musculaire. Parmi ces études, *Rinkinen et coll* ont montré que l'inflammation engendrée par une brûlure pouvait amplifier l'atrophie musculaire de souris ayant subi une ténotomie du tendon d'Achille⁴⁴³. Ces effets sont notamment médiés par une augmentation de la phosphorylation du facteur NFκB et une surexpression d'Atrogin-1. Similairement, *Corrick et coll* ont montré *in vitro* qu'un milieu supplémenté avec du sérum de sujets brûlés entraînait des défauts de myogenèse des myotubes traités, associés à une réduction de la synthèse protéique et du volume cellulaire⁴⁴⁴. Sur la base de ces études nous avons fait l'hypothèse que le microenvironnement sérique de patients BPCO pouvait altérer la différenciation de myoblastes sains.

Similairement à l'étude 2, nous avons observé que le sérum provenant de patients BPCO légers réduit le diamètre des myotubes exposés. En effet, si nos résultats concernant le diamètre des myotubes ne montrent aucune différence significative, l'analyse en fréquence de distribution cumulée relative montre cependant un effet atrophiante du sérum G0-I, entraînant un *shift* vers des myotubes plus fins (Fig.1A-B).

De manière intéressante, cet effet du sérum de patients G0-I sur le diamètre des myotubes sains est dépendant de l'expression de MyoD, MyoG et PGC1α qui diminue dans les myotubes exposés (Fig.2). Ceci suggère une interrelation entre le diamètre des myotubes et l'expression de ces différents marqueurs, comme cela a été mis en évidence par des corrélations entre l'expression de chacun de ces marqueurs et le diamètre des myotubes (Fig.2D-F), mais également dans une récente étude. En effet, les auteurs ont montré que l'extinction de l'expression de PGC1α est associée à la réduction de l'expression des marqueurs myogéniques MyoD et MyoG⁴⁴⁵, entraînant une inhibition de la différenciation de cellules C2C12. Dans notre étude, ce processus semble également être impliqué, avec des répercussions délétères sur le diamètre des myotubes exposés au sérum de patients G0-I.

Nous avons observé un niveau d'expression de myostatine plus faible dans les myotubes sains exposés au sérum BPCO. Ce résultat semble paradoxal sachant qu'il a été décrit que les niveaux de myostatine circulante et musculaire sont augmentés chez les patients BPCO, suggérant que, appartenant à la superfamille des TGF/BMP/Activin, un taux de myostatine plus élevé serait responsable d'une partie de l'atrophie musculaire des patients et devrait par conséquent provoquer l'atrophie des myotubes en culture^{131,446}. Nos

observations sont toutefois en accord avec cette analyse, car la myostatine est une protéine dont l'expression est modulée par une boucle d'auto-régulation⁴⁴⁷. Il est donc probable que la baisse d'expression de myostatine dans les myotubes sains exposés au sérum de patients BPCO G0-I soit due à la présence « accrue » de myostatine dans le sérum BPCO.

Effet paradoxal du sérum des patients BPCO les plus sévères sur la différenciation des myotubes sains : phénomène de compensation ?

Paradoxalement, si l'hypothèse d'un effet atrophique du sérum de patients BPCO légers (G0-I) semble être étayée par les résultats de la présente étude et ceux de l'étude 2, cela ne semble pas être le cas pour les myotubes exposés à du sérum de patients dont la sévérité de la maladie est plus importante. En effet, à l'inverse des résultats relatifs au sérum de patients BPCO G0-I, nous n'avons pas observé de phénomène d'atrophie dans les myotubes sains exposés à du sérum de patients modérés (GII-III) et sévères (GIV). Nous avons d'ailleurs observé une tendance à l'augmentation progressive du diamètre des myotubes en fonction de la sévérité, avec un profil « en marche d'escalier » (Fig.1A).

Ce profil en « marche d'escalier » a également été retrouvé concernant l'expression de PGC1 α , MyoD et MyoG ce qui supporte l'hypothèse d'une interdépendance entre le diamètre des myotubes, l'avancement de la différenciation et l'expression de PGC1 α ⁴⁴⁵. Cependant, comment expliquer que le sérum des patients les plus sévères stimule l'expression de PGC1 α ? Ce phénomène pourrait être un mécanisme de compensation des myoblastes sains en réponse à un stress. Cela a notamment été décrit dans le cas des cellules tumorales ovariennes qui, étant exposées à de grandes quantités de ROS, réagissent en surexprimant PGC1 α afin d'activer les voies anti-oxydantes protectrices⁴⁴⁸. Dans le cas de notre étude, les patients BPCO présentant généralement une élévation du stress oxydant systémique, il est donc possible que l'exposition des myoblastes sains à un microenvironnement enrichi en molécules pro-oxydantes constitue un stimulus suffisant pour induire une élévation de l'expression de PGC1 α dans ces cellules et ainsi faciliter la différenciation. Il est également possible que ce phénomène soit dû à la présence de biomarqueurs pro-régénératifs dans la circulation systémique des patients, confortant les théories d'activation de processus compensateurs chez les patients BPCO.

L'hypothèse d'un mécanisme de compensation se répercutant par le relargage de molécules pro-régénératives dans la circulation systémique permet notamment d'apporter une explication à nos résultats paradoxaux concernant la réduction d'expression de la myostatine. En effet, si dans les myotubes exposés à du sérum de patients G0-I nous

observons une atrophie accompagnée d'une répression de la myostatine, nous devrions également observer cette atrophie dans les myotubes exposés à du sérum de patients plus sévères. Or nous n'observons qu'une répression de la myostatine. Ceci pourrait être dû au relargage de molécules pro-régénératives, en fonction de la sévérité. Ainsi, la répression de la myostatine dans les myotubes sains exposés à du sérum de patients BPCO peut s'expliquer par un niveau élevé de myostatine sérique, mais peut également s'expliquer par le relargage dans le sang d'autres molécules telles que BAMBI (*BMP and Activin Membrane-Bound Inhibitor*). BAMBI est en effet une protéine inhibitrice des voies TGFs, qui est surexprimée dans le sang de patients BPCO et qui pourrait réprimer l'expression de myostatine^{449,450}. Ce pseudo-récepteur (sans domaine intracellulaire à activité sérine/thréonine kinase) est capable de promouvoir la différenciation de cellule C2C12⁴⁵¹, ce qui permet d'envisager que si BAMBI est surexprimé dans le sérum des patients BPCO, les myotubes exposés à leur microenvironnement pourraient également présenter une hypertrophie associée à une réduction de l'expression de la myostatine. Ces deux éléments vont dans le sens d'un effet trophique positif du microenvironnement des patients BPCO sur des myoblastes sains, et plus particulièrement pour le microenvironnement des patients les plus sévères qui contiendrait en conséquence une quantité plus importante de molécules compensatrices (Fig. 3).

Le microenvironnement BPCO favorise l'expression de MuRF1 :

A l'image des résultats décrivant le rôle catabolique du microenvironnement de patients en choc septique sur des myotubes humains sains⁴⁵², le sérum de patients BPCO semble, graduellement en fonction de la sévérité, promouvoir la surexpression de MuRF1 (Fig 4). Cette fois encore, bien que les variations d'expression ne soient pas significatives, on distingue un profil d'expression en « marche d'escalier » supportant l'hypothèse de la présence plus importante de molécules délétères dans le microenvironnement en fonction de la sévérité de la maladie.

Ces résultats apparaissent contre-intuitifs vis-à-vis des variations du diamètre des myotubes en fonction de la sévérité, cependant nous n'avons aucune donnée concernant l'expression de marqueurs de la synthèse protéique ou sur la présence de facteurs pro-régénératifs dans le sérum. Il est donc possible qu'un effet compensateur puisse également expliquer les effets observés.

Limites

La plus grande limite de ces résultats provient des tendances non significatives observées. Il semblerait donc que nos expérimentations manquent de puissance statistique, principalement à cause d'une faible taille d'échantillon (n=6). Il est donc envisageable qu'un plus grand nombre d'expérimentations permettrait d'atteindre une puissance statistique validant les tendances de nos résultats.

Néanmoins, les tendances observées sont étayées par des données de la littérature suggérant que plusieurs expériences complémentaires permettraient de renforcer nos résultats. Parmi les expériences nécessaires, il est primordial de procéder au dosage des échantillons sériques utilisés pour chaque condition afin d'identifier et de quantifier les biomarqueurs susceptibles d'être impliqués dans les processus de différenciation. Entre autre, il est primordial de procéder au dosage de cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF α , connu pour être impliqué dans l'induction d'enzymes du catabolisme (ex : MuRF1, Atrogin-1) *via* le facteur NF κ B^{218,453}. Le dosage de la myostatine, de BAMBI ou encore de micro-ARN (miRNA), tel que le miR-206 qui est augmenté chez les patients BPCO, pourrait traduire une activation des processus de différenciation musculaire, probablement en compensation de signaux pro-atrophiques^{325,328}. De manière générale, ce dosage des échantillons nous permettra d'évaluer la composition du microenvironnement auquel sont exposés les cellules musculaires de patients BPCO et de statuer sur un lien entre le caractère potentiellement délétère du microenvironnement et la sévérité des patients.

La méthode d'évaluation de la sévérité des patients selon le déclin du VEMS (classification GOLD) est d'ailleurs une autre limite de notre approche expérimentale. N'ayant pas accès aux questionnaires évaluant la dyspnée des patients, il nous était impossible de définir des groupes de sévérité selon l'index BODE. Néanmoins, bien que le déclin du VEMS soit un indicateur moins représentatif des atteintes périphériques musculaires, il est cependant associé à la présence de biomarqueurs circulants en lien avec des dégâts tissulaires. En effet, il a été montré comme associé à une élévation de la concentration plasmatique de cytokines inflammatoires et à la réduction de marqueurs circulants de réparation/régénération²⁸⁷. Et bien que nous n'ayons pas pu évaluer l'atrophie musculaire des patients de cette étude, nous avons cependant observé une nette atteinte des capacités d'endurance au TDM6, suggérant une diminution des capacités oxydatives musculaires.

Enfin, des expérimentations complémentaires sont nécessaires afin de statuer sur l'hypothèse que le sérum de patients BPCO contient des molécules pro-régénératives induisant les effets hypertrophiques observés dans nos expérimentations. En effet, nos résultats suggèrent que le microenvironnement de patients BPCO sévères favorise la différenciation des myotubes sains, ce qui semble contradictoire avec notre hypothèse de travail initiale. Cependant, ces observations traduisent potentiellement la capacité des myoblastes sains à être stimulés par un microenvironnement riche en molécules pro-régénératives, et que des myoblastes BPCO pourraient en revanche être insensibles à ces facteurs. Cette insensibilité mettrait en évidence des altérations intrinsèques des cellules satellites BPCO, un phénomène qui a préalablement été décrit concernant la réduction des télomères dans les fibres musculaires BPCO^{123,124}. Le phénomène d'insensibilité est un mécanisme couramment décrit dans l'insulinorésistance⁴⁵⁴, la glucorésistance liée au stress chronique⁴⁵⁵ et la chimiorésistance des cellules tumorales⁴⁴⁸. En réponse à un signal d'alerte, l'organisme enclenche un mécanisme de compensation pour répondre au stimulus. Cependant, ce processus est généralement énergivore et donc non-viable à long terme pour l'organisme, entraînant le phénomène d'épuisement. Dans le cadre de la BPCO, il est possible que les capacités régénératives du tissu musculaire soient épuisées¹²⁴, rendant celui-ci insensible aux molécules pro-régénératives présentes dans la circulation sanguine (voir schéma ci-après). Des expérimentations complémentaires, en exposant des myoblastes malades à un microenvironnement BPCO, permettraient ainsi d'illustrer ce mécanisme et confirmeraient le caractère délétère du microenvironnement BPCO sur la différenciation des cellules musculaires BPCO.

	GOLD 0-I	Atrophie	Effets pro-atrophiques	Compensation	
				Cellule	Sérum
Cellule saine	GOLD 0-I	Atrophie	+	-	-
	GOLD II-III	Normal	++	+	+
	GOLD IV	Hypertrophie	+++	++	++
Cellule BPCO	GOLD IV	Atrophie ?	+++	- ?	++

● Molécule pro-atrophiante ● Molécule pro-régénérative

Représentation de l'hypothèse des effets du sérum de patients BPCO et des phénomènes de compensation

V. Conclusion :

Nous pouvons conclure que le microenvironnement de patients BPCO modifie les processus de différenciation des myotubes humains sains comparé au sérum de sujet sains, et ce de manière graduelle en fonction de la sévérité de la maladie. La sévérité de la maladie semble avoir des répercussions sur la composition du sérum de patients BPCO, de sorte que le sérum des sujets légers a des effets différentiels comparé au sérum de sujets sévères. Si le sérum de sujets légers semble être pro-atrophique, le sérum de sujets sévères semble au contraire promouvoir la différenciation. Cet effet paradoxal pourrait être dû à la présence de molécules pro-régénératives dans le microenvironnement BPCO en compensation des signaux pro-cataboliques induits dans les myotubes sains par le sérum des patients BPCO sévères. L'ensemble de ces résultats indique que la composition du microenvironnement systémique pourrait être déstabilisé par la maladie et perturberait ainsi la dynamique de régénération musculaire, conduisant à l'apparition d'une atrophie musculaire chez le patient BPCO.

Etude 4 : Le réentraînement à l'effort ne permet pas d'inverser les signaux atrophiques du sérum de patients BPCO sur les myotubes sains *in vitro*

I. Introduction :

Le REE est la pierre angulaire de la RR pour les patients atteints de maladies respiratoires chroniques telle que la BPCO^{234,456,457}. Il constitue aujourd'hui la meilleure approche thérapeutique pour répondre à l'intolérance à l'effort des patients, en permettant notamment de réduire la charge que représente l'effort musculaire sur la respiration en promulguant des adaptations musculaires^{241,458,459}. Cependant, malgré une grande flexibilité et complémentarité des programmes d'activité physique¹³³, les bénéfices apportés par le REE restent encore incomplets.

D'une part, il est reconnu qu'environ un tiers des patients ne répond pas aux effets du REE²⁶⁵. D'autre part, même chez les patients dits « répondeurs », les gains restent moins importants comparé aux gains observés chez des sujets sains tant dans l'amplitude^{266,267}, que dans la durée des effets²⁶⁸. Notre équipe a d'ailleurs observé des gains de consommation maximale d'oxygène à l'effort moins importants chez des sujets BPCO comparés à des sujets sains appariés, ainsi que des progrès moins importants concernant l'endurance musculaire et la force^{266,267}. Ces bénéfices réduits semblent être supportés par des défauts d'adaptation relatifs à la capillarisation induite par l'exercice chez les patients, par une absence d'effet sur le *shift* typologique musculaire ainsi que par des défauts d'adaptation cardiaque à l'effort.

Malgré des bénéfices évident sur l'utilisation des services de santé, plusieurs études ont mis en évidence un déclin dans le temps de la tolérance à l'effort dans les 6 à 12 mois suivant la fin du programme initial de RR^{333,460,461}. De manière surprenante, ni les programmes répétés de RR, ni les programmes de maintenance n'ont à l'heure actuelle permis de prolonger au-delà de 2 ans les bénéfices initiés par la RR initiale^{268,462}. Il est probable que le manque de persistance des changements comportementaux initiés par la RR soit en grande partie responsable de ce déclin. Cependant, l'inefficacité du REE sur les facteurs inflammatoires et du stress oxydant dans la circulation sanguine, pourrait également être à l'origine des limites des effets bénéfiques induits³³³.

La relation entre l'exercice et les facteurs circulants du stress oxydant et de l'inflammation est encore mal compris. Alors que l'activité physique régulière, chez les sujets sains comme chez certains malades chroniques, permet de maintenir les défenses antioxydantes au cours du vieillissement⁴⁶³ et de réduire le stress oxydant induit par l'exercice^{464,465}, l'activité physique régulière chez le patient BPCO semble moins efficace. En effet, plusieurs études ont montré que les patients souffraient d'un déséquilibre du statut redox à la suite d'un entraînement de plusieurs semaines, suggérant que l'exercice est

susceptible d'épuiser les capacités antioxydantes musculaires chez les patients^{206,466,467}. D'autres études ont en revanche nuancé cette vision, en montrant que malgré un niveau de stress oxydant basal et post-exercice plus important, l'entraînement permettait malgré tout d'améliorer les capacités fonctionnelles des patients BPCO, tout en prévenant le stress oxydant induit par un exercice physique sous-maximal^{207,468}. Cependant, le fait qu'un stress oxydant résiduel subsiste, laisse à penser qu'il pourrait participer à la fatigue musculaire chez les patients et limiter les effets bénéfiques de l'entraînement.

De manière similaire, alors que l'entraînement permet de réduire l'inflammation de bas grade s'installant au cours du vieillissement ou dans certaines conditions pathologiques^{469,470}, il semble n'avoir que des effets très limités chez les patients BPCO^{207,333,471}. Il est donc possible que si, ni l'entraînement, ni le REE ne permettent de rétablir un microenvironnement musculaire propice aux mécanismes de régénération, alors les bénéfices induits par ces approches risqueront d'être limités.

Les répercussions moléculaires du REE sur les processus de différenciation de la cellule satellite sont encore peu connues. Si les cytokines inflammatoires, *via* une dynamique d'expression finement régulée, sont nécessaires pour promouvoir la myogenèse, leur présence chronique dans le microenvironnement musculaire est à l'origine d'altérations des processus de différenciation²¹⁴. A titre d'exemple, l'IFN γ et le TNF α modulent l'expression de gènes impliqués dans la différenciation musculaire. D'une part, l'IFN γ est capable d'induire la fixation du transactivateur de type II du complexe majeur d'histocompatibilité (CIITA) à la myogénine afin de réprimer l'expression de gènes clés de la différenciation⁴⁷². D'autre part, le CIITA est également susceptible de réprimer la transcription de groupes de gènes musculaires, en entraînant la dissociation de l'ARN polymérase II et le recrutement du complexe répresseur *Polycomb*, menant ainsi à une répression épigénétique stable⁴⁷³. Similairement, le TNF α , en stimulant de manière paracrine et autocrine la voie p38MAPK dans les premières heures de la différenciation, est nécessaire à l'expression de gènes tels que MEF2C et myogénine⁴⁷⁴. Ces résultats montrent que ces deux cytokines peuvent avoir un rôle crucial dans la régulation de la différenciation musculaire et être impliquées, au même titre que le stress oxydant, dans les dysfonctions musculaires.

Dans cette étude, nous avons fait l'hypothèse que le REE, n'améliorant pas le statut oxydant et inflammatoire systémique des patients BPCO, ne permettrait pas de rétablir un microenvironnement musculaire propice à la différenciation de myoblastes sains. L'objectif est donc d'étudier si l'exposition *in vitro* de myoblastes sains à du sérum de patients BPCO

ayant suivi un REE de 5 semaines, altère la morphologie des myotubes en entraînant des anomalies de la différenciation, pouvant conduire *in vivo* à des troubles de la régénération.

II. Procédure expérimentale :

Similairement aux études 2 et 3, nous avons cultivé des myoblastes provenant de 8 sujets sains (caractéristiques en tableau 1) dans un milieu de prolifération (DMEM / 20% SVF / 0,5% Ultrosér G) puis induit leur différenciation en les exposant à un milieu de différenciation composé de 2% de sérum de sujets sains ou de patients BPCO avant ou après avoir suivi un REE de 5 semaines (voire fiches techniques n°3 « Réentraînement à l'effort » et n°7 « Culture primaire de myoblastes humains »). Le sérum utilisé dans chaque condition correspond à un mix de plusieurs échantillons sériques provenant de 6 sujets (tableau 2).

Tableau 1 : Caractéristiques des sujets sains dont sont issues les cellules

	Sujets sains (n=8)
Age (années)	62,0±5,8
IMC (kg/m ²)	25,6±3,4
IMM (kg/m ²)	19,2±1,9
FMVq (kg)	28,7±7,1*
VEMS (L)	3,28±0,69
(%préd)	102±12,3
TDM6 (m)	611±41,6
(%préd)	89,4±9,3

IMC : Indice de masse corporelle,

IMM : Indice de masse maigre,

FMVq : Force maximale volontaire du quadriceps,

VEMS : Volume expiré maximal en 1 seconde,

TDM6 : Test de marche de 6 minutes

**une donnée manquante*

A l'issue des 5 jours de différenciation, les myotubes sont préparés selon la procédure décrite par la fiche technique n°7 « Immunofluorescence des myotubes et analyses de la morphologie cellulaire » et imagés afin de mesurer le diamètre des myotubes et d'évaluer les potentiels effets trophiques des différents séra.

D'autre part, les ARN et protéines sont extraits selon les procédures décrites dans la fiche technique n°8 « Extraction et purification des protéines et ARN totaux », afin d'analyser l'expression des différents marqueurs par qPCR et *Western Blot*, respectivement. L'ensemble des procédures relatives à ces deux méthodes, aux séquences d'amorces et aux anticorps utilisés sont décrites dans les fiches techniques n°9 « RT-qPCR » et n°10 « SDS-PAGE et *Western Blot* ».

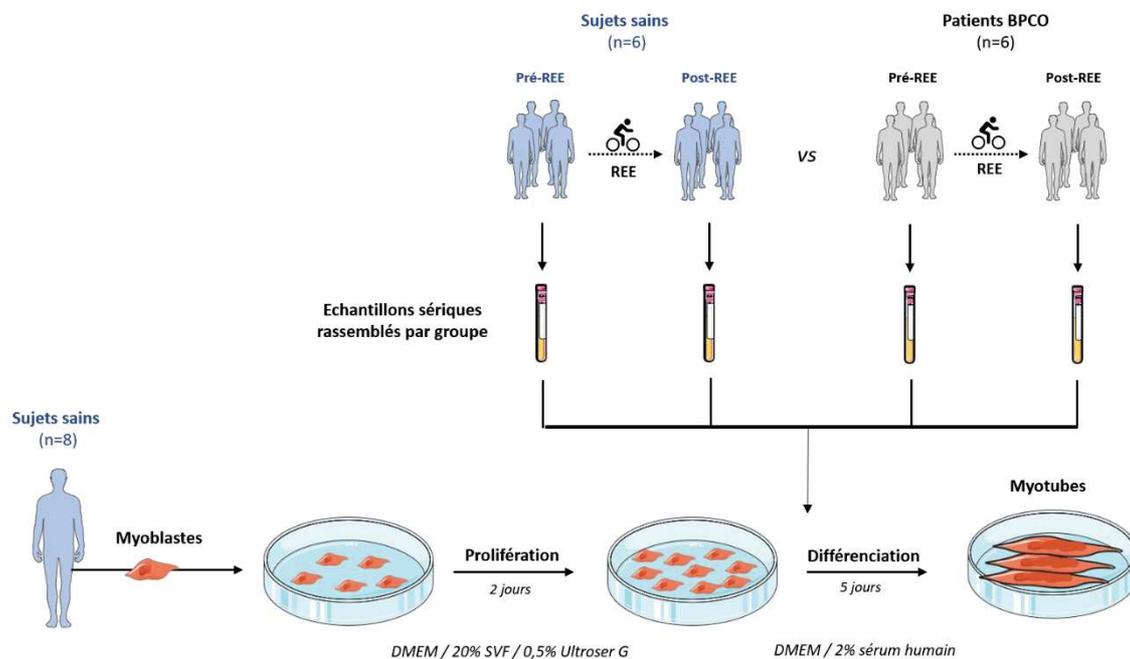


Schéma expérimental de l'étude 4

III. Résultats :

Caractéristiques basales des sujets sains et patients BPCO

Les caractéristiques basales des sujets sains et patients BPCO dont le sérum a été utilisé pour les expérimentations sont décrites dans le tableau 2. Les deux groupes de sujets ont été appariés sur l'âge, l'IMC et l'IMM, et présentent une différence significative sur le VEMS ($p < 0,004$) avec 1 patient GOLD II, 3 patients GOLD III et 2 patients GOLD IV. Les patients BPCO présentent également un déficit de tolérance à l'effort au TDM6 ($p < 0,002$).

Tableau 2 : Caractéristiques basales des sujets sains et patients BPCO dont sont issus les séra utilisés

	Sujets sains (n=6)	Patients BPCO (n=6)	Significativité
Age (années)	63,2±6,6	59,8±10,4	0,33
VEMS (L)	2,60±0,78	1,16±0,40	0,004
(% _{préd})	106±19	38,5±11,9	0,002
GOLD	-	I (0) / II (1) / III (3) / IV (2)	-
BODE	-	4±1	-
IMC (kg/m ²)	27,2±2,8	24,6±5,9	0,46
IMM (kg/m ²)	17,7±3,1	16,7±3,3*	0,54
TDM6 (m)	673±82,1	406±93,2	0,002
(% _{préd})	112±8,7	58,6±13,0	0,002
FMVq (kg)	42,3±12,8	32,4±13,3	0,24

IMC : Indice de masse corporelle, IMM : Indice de masse maigre, VEMS : Volume expiré maximal en 1 seconde, TDM6 : Test de marche de 6 minutes, FMVq : Force maximale volontaire du quadriceps

*une donnée manquante

Effets de la réhabilitation

Comme le montre le tableau 3, la réhabilitation a eu des effets similaires sur l'IMC ($+0,7 \pm 2,1$ vs $+0,5 \pm 3,0\%$, $p=0,94$) et sur l'IMM ($+1,8 \pm 4,7$ vs $-0,4 \pm 5,7\%$, $p=0,33$) dans les deux groupes de sujets et a significativement amélioré l'endurance au TDM6 des patients ($+1,5 \pm 7,4$ vs $15,3 \pm 10,4\%$, $p=0,04$), avec notamment cinq patients sur six qui ont eu des gains supérieurs à la distance minimale cliniquement pertinente de 30m⁴⁷⁵. Cette différence est attribuable à un déficit fonctionnel basal chez les patients BPCO, avec un effet « plafond » de la réhabilitation chez les sujets sains.

Tableau 3 : Effets de la réhabilitation sur les caractéristiques morpho-fonctionnelles des sujets sains et patients BPCO

	Sujets sains (n=6)	Patients BPCO (n=6)	Significativité
IMC (% _{pré-REE})	$+0,7 \pm 2,1$	$+0,5 \pm 3,0$	0,94
IMM (% _{pré-REE})	$+1,8 \pm 4,7$	$-0,4 \pm 5,7$	0,33
FMVq (% _{pré-REE})	$+3,0 \pm 5,5$	$+16,6 \pm 18,8$	0,18
TDM6 (% _{pré-REE}) (m)	$+1,5 \pm 7,4$ $+6,5 \pm 50$	$+15,3 \pm 10,4$ $+65 \pm 48$	0,04

IMC : Indice de masse corporelle, IMM : Indice de masse maigre, FMVq : Force maximale volontaire du quadriceps, TDM6 : Test de marche de 6 minutes

Le sérum de patients BPCO après-REE n'induit pas d'augmentation du diamètre des myotubes contrairement au sérum de sujets sains

Nous nous sommes intéressés aux effets induits par le REE à travers les modifications morphologiques observés entre des myotubes sains exposés à du sérum de patients BPCO ou de sujets sains, en comparant dans chaque condition les différences entre le sérum avant et après REE (Av-/Ap-REE). Nous avons constaté qu'à l'état basal, le sérum de patients BPCO Av-REE entraîne une augmentation du diamètre des myotubes comparé au sérum de SHS Av-REE ($0,390 \pm 0,143$ vs $0,261 \pm 0,068$ u.a, $+49,8\%$; $p = 0,0001$) (Fig.1A). D'autre part, les myotubes exposés à du sérum SHS Ap-REE ont tendance à avoir un diamètre plus important que ceux exposés au sérum SHS Av-REE ($55,6 \pm 12,4$ vs $48,8 \pm 12,7$ μm – $+13,8\%$, $p = 0,078$; Fig.1A). Inversement, nous avons observé que les myotubes exposés à du sérum de patients BPCO Ap-REE ont tendance à être plus fins que ceux exposés au sérum BPCO Av-REE ($68,2 \pm 25,2$ vs $73,2 \pm 26,8$ μm , $-6,8\%$; Fig.1A). De plus, l'analyse des variations individuelles Av-/Ap-REE du diamètre des myotubes souligne

clairement cette différence significative d'effet du REE sur le sérum dans chaque condition. En moyenne les myotubes exposés à du sérum SHS bénéficient d'une augmentation du diamètre de $16,7 \pm 21,4\%$, contre une réduction moyenne du diamètre de $5,1 \pm 16,3\%$ pour les myotubes exposés à du sérum de patients BPCO, représentant une différence absolue de $21,8 \pm 21,5\%$ ($p=0,039$) (Fig.1B).

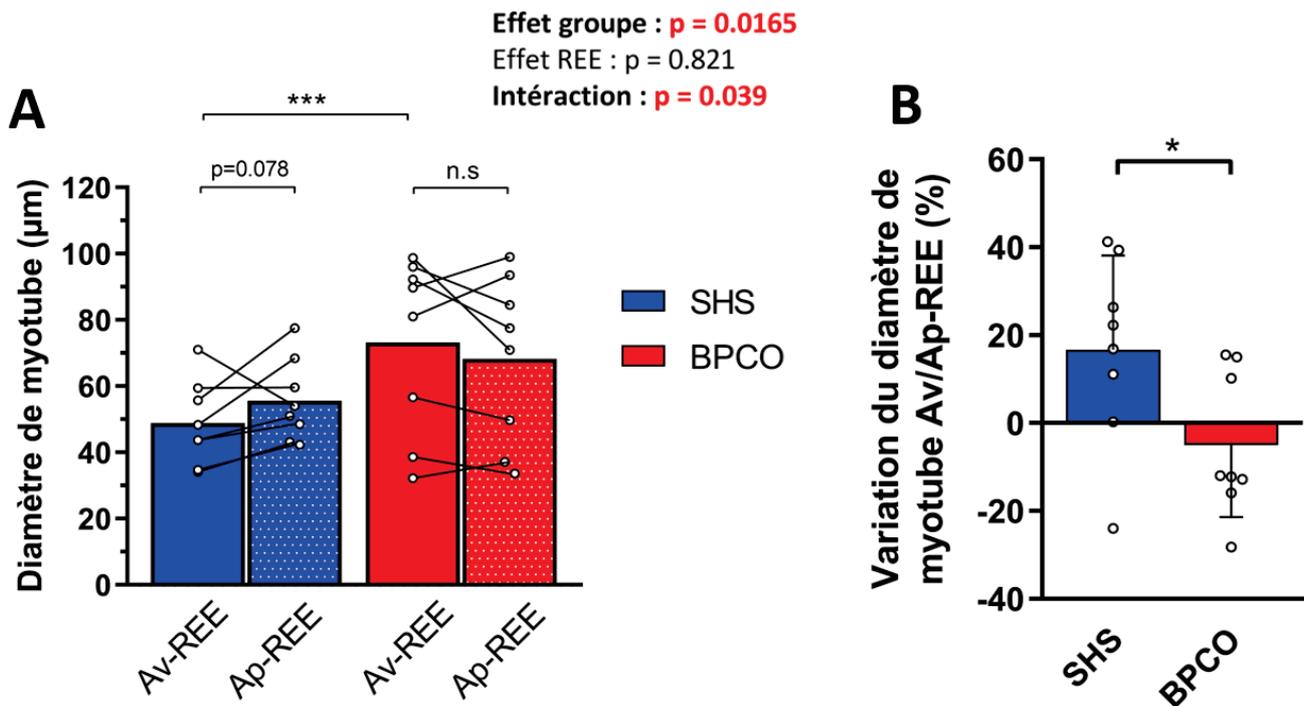


Figure 1 : Effets du sérum de patients BPCO avant et après REE comparé aux effets du sérum de sujets sains avant et après REE sur le diamètre des myotubes sains : (A) Quantification du diamètre des myotubes de sujets sains différenciés dans un milieu composé de 2% de sérum de sujets sains ou BPCO, avant et après REE (mélange d'échantillons de 6 sujets/groupe). Dans chaque condition, la ligne reliant deux points indique les cultures d'un même sujet traitées avec du sérum Av-REE et Ap-REE. L'ANOVA à une voie à mesures répétées indique un effet groupe et un effet d'interaction. (B) Quantification des variations du diamètre des myotubes induites par le sérum BPCO Ap-REE par rapport au sérum sains Ap-REE pour chaque culture primaire (exprimée en pourcentage de variation par rapport à la condition Av-REE). (*) indique une différence significative à $p < 0,05$ au test de rang signé de Wilcoxon.

Le sérum de patients BPCO Ap-REE induit la surexpression de gènes de la dégradation protéique par rapport au sérum de sujets sains

Afin d'identifier l'origine de ces modifications morphologiques, nous nous sommes intéressés aux variations d'expression de gènes impliqués dans la dégradation et la synthèse protéique entre les myotubes exposés à du sérum SHS ou de patients BPCO, en comparant les variations Av/Ap-REE. Les myotubes exposés à du sérum de patients BPCO Ap-REE montrent une élévation de l'expression des enzymes du système UPS, MuRF1 et d'Atrogin1, comparé au sérum SHS Ap-REE (respectivement $-2,5 \pm 22,7$ vs $+68,4 \pm 96,1\%$, $p=0,016$ et $+13,4 \pm 50,8$ vs $+47,7 \pm 47,4\%$, $p=0,016$; Fig.2A). En revanche, nous n'observons pas de différence significative dans les variations d'expression de Nedd4.

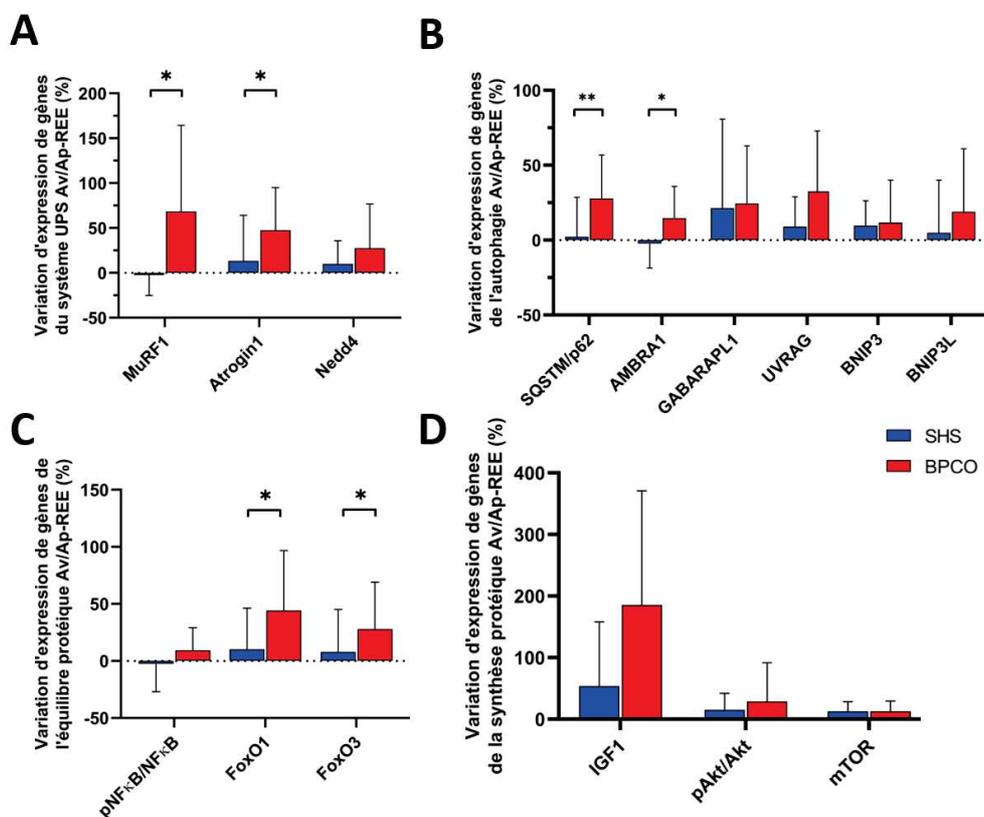


Figure 2 : Effets du sérum de patients BPCO après REE comparé au sérum de sujets sains après REE sur les variations d'expression de gènes impliqués dans la balance protéique des myotubes sains: Quantification des variations d'expression induites par le sérum BPCO Ap-REE par rapport au sérum SHS Ap-REE sur des marqueurs impliqués dans (A) le système UPS (MuRF1, Atrogin1, Nedd4), (B) l'autophagie (SQSTM1/p62, AMBRA1, GABARAPL1, UVRAG, BNIP3, BNIP3L), (C) la signalisation atrophique (pNFκB/NFκB, FoxO1, FoxO3), et (D) la synthèse protéique (IGF1, pAkt/Akt, mTOR), exprimées en pourcentage de variation par rapport à la condition Av-REE dans les cultures primaires de 8 sujets sains. (*) et (**) indiquent respectivement une différence significative à $p < 0,05$ et $p < 0,01$ au test de rang signé de Wilcoxon. L'ensemble des quantifications a été réalisé par qPCR sauf les ratios pNFκB/NFκB et pAkt/Akt qui ont été réalisés par *Western Blot*.

De même, concernant les variations d'expression de marqueurs de l'autophagie, nous observons que le sérum de patients BPCO Ap-REE entraîne la surexpression de SQSTM/p62 et AMBRA1 comparé au sérum de SHS Ap-REE (respectivement $+2,3 \pm 26,2$ vs $+27,8 \pm 29,0\%$ $p=0,008$ et $-2,3 \pm 16,3$ vs $+14,7 \pm 21,3\%$ $p=0,039$) (Fig.2B). En revanche, nous n'observons aucune différence significative dans les variations d'expression de quatre autres marqueurs de l'autophagie (GABARAPL1, UVRAG, BNIP3 et BNIP3L). A noter cependant que de manière globale, le sérum de patients BPCO Ap-REE a tendance à entraîner la surexpression de l'ensemble des gènes du catabolisme étudiés, comparé au sérum SHS Ap-REE (Fig.2A-B).

Le sérum de patients BPCO Ap-REE entraîne également la surexpression de FoxO1 et FoxO3 comparativement au sérum SHS Ap-REE (respectivement $+10,2 \pm 36,0$ vs $+44,2 \pm 52,5\%$ $p=0,039$ et $+7,9 \pm 37,3$ vs $+27,9 \pm 41,2\%$ $p=0,023$) (Fig.2C). En revanche, nous n'observons pas de différence significative concernant les variations d'expression de marqueurs de la synthèse protéique (IGF1, ratio pAkt/Akt, mTOR) (Fig.2D), suggérant un potentiel déséquilibre entre la synthèse et la dégradation protéique chez les myotubes exposés à du sérum de patients BPCO Ap-REE.

Le sérum BPCO Ap-REE active les étapes précoces de la différenciation par rapport au sérum de sujets sains

Nous nous sommes intéressés à l'induction de la différenciation des myotubes en étudiant l'expression des marqueurs MyoD, Myf5, MyoG et PGC1 α . Les myotubes exposés au sérum SHS Ap-REE voient l'expression de MyoD baisser alors que les myotubes exposés au sérum de patients BPCO Ap-REE surexpriment MyoD ($-10,5 \pm 9,5$ vs $+6,1 \pm 26,6\%$, $p=0,039$) (Fig.3A). D'autre part, le sérum de patients BPCO Ap-REE a tendance à augmenter significativement l'expression de Myf5, comparé au sérum SHS Ap-REE ($+16,0 \pm 41,4$ vs $+40,9 \pm 41,4\%$, $p=0,055$) (Fig.3A). En revanche, nous ne constatons pas de différence concernant les variations d'expression de MyoG, avec une augmentation similaire entre les myotubes exposés à du sérum de patients BPCO ou de SHS Ap-REE (Fig.3A).

Dans la précédente étude, nous avons observé que l'expression de PGC1 α était intimement liée à celle de MyoD et MyoG, c'est pourquoi nous avons également analysé les variations de ce marqueur. Bien que les variations ne soient pas significatives, le sérum de patient BPCO Ap-REE a tendance à induire la surexpression de PGC1 α , comparé au sérum SHS Ap-REE ($+1,3 \pm 41,3$ vs $+70,2 \pm 98,4\%$, $p=0,14$) (Fig. 3B). L'ensemble de ces résultats

suggère que la surexpression des marqueurs de la différenciation dans les myotubes sains exposés à du sérum de patients BPCO Ap-REE soit le reflet d'un effet compensatoire à la surexpression des marqueurs cataboliques.

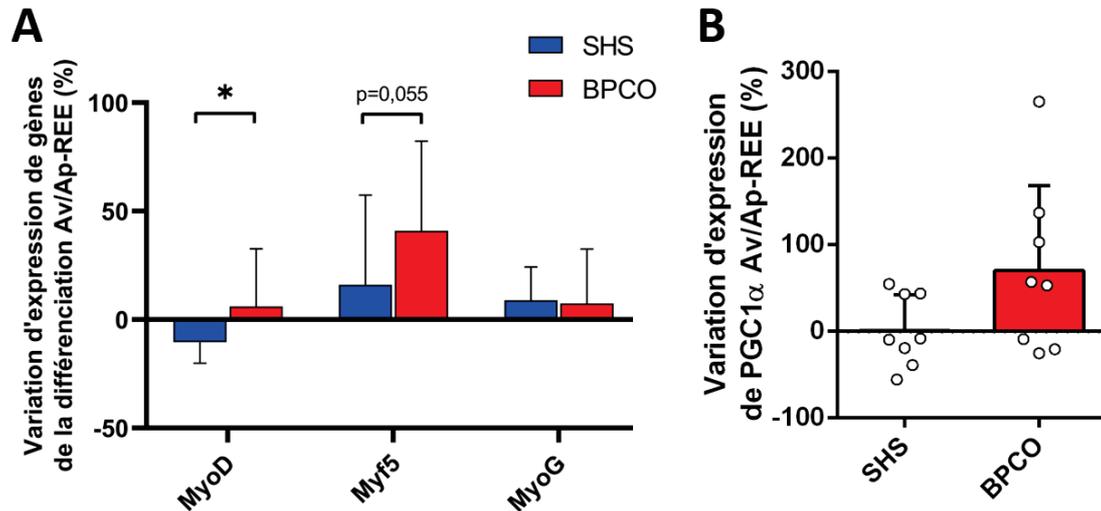


Figure 3 : Effets du sérum de patients BPCO après REE comparé au sérum de sujets sains après REE sur les variations d'expression de MyoD, Myf5, MyoG et PGC1α des myotubes sains: Quantification des variations d'expression induites par le sérum BPCO Ap-REE par rapport au sérum sains Ap-REE sur les marqueurs de la différenciation (A) MyoD, Myf5 et MyoG, et sur (B) PGC1α, exprimées en pourcentage de variation par rapport à la condition Av-REE dans les cultures primaires de 8 sujets sains. (*) indique une différence significative à $p < 0,05$ au test de rang signé de Wilcoxon. L'ensemble des quantifications a été réalisé par qPCR.

Le sérum de patients BPCO Ap-REE induit une augmentation de la synthèse de la myostatine

Etant donné que la myostatine est impliquée dans la régulation de la masse musculaire, nous nous sommes intéressés au rôle du sérum BPCO Ap-REE sur les variations d'expression de la myostatine. Similairement à l'étude 3, nous remarquons que le sérum de patients BPCO à l'état basal a tendance à réprimer l'expression de la myostatine ($0,598 \pm 0,35$ vs $0,405 \pm 0,23$ u.a, $p = 0,052$) (Fig.4A). En revanche, tandis que les myotubes exposés à du sérum SHS Ap-REE ne présentent aucune variation significative de l'expression de la myostatine par rapport au sérum SHS Av-REE, nous mesurons une augmentation significative de l'expression de la myostatine en réponse au sérum de patients BPCO Ap-REE ($+1,4 \pm 21,2\%$ vs $+60,2 \pm 63,8\%$, $p = 0,039$) (Fig.4B).

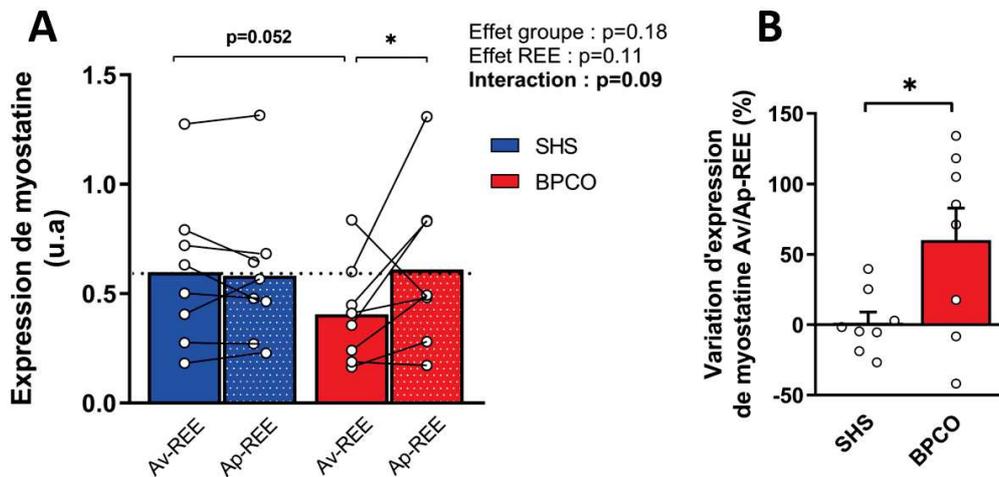


Figure 4 : Effets du sérum de patients BPCO avant et après REE comparé au sérum de sujets sains avant et après REE sur l'expression de myostatine des myotubes sains : (A) Quantification de l'expression de myostatine dans les myotubes de 8 sujets sains différenciés dans un milieu composé de 2% de sérum de sujets sains ou BPCO, Av- et Ap-REE (mélange d'échantillons de 6 sujets/groupe). Dans chaque condition, la ligne reliant deux points indique les cultures d'un même sujet traitées avec du sérum Av-REE et Ap-REE. L'ANOVA à une voie à mesures répétées n'indique aucune différence statistiquement significative. (B) Quantification des variations d'expression induites par le sérum BPCO Ap-REE par rapport au sérum sains Ap-REE sur la myostatine, exprimées en pourcentage de variation par rapport à la condition Av-REE dans les cultures primaires de 8 sujets sains. (*) indique une différence significative à $p < 0,05$ au test de rang signé de Wilcoxon.

IV. Discussion :

Dans cette 4^{ème} étude du travail de thèse, nos résultats indiquent que le sérum de sujets sains Ap-REE induit une augmentation du diamètre des myotubes, alors que le sérum de patients BPCO Ap-REE induit une réduction du diamètre des myotubes (Fig.1). Cet effet opposé sur la morphologie des myotubes sains s'accompagne d'une élévation de l'expression de marqueurs de la dégradation protéique du système UPS et de l'autophagie pour le sérum BPCO Ap-REE, sans modification de l'expression de marqueurs de la synthèse protéique (Fig.2). De manière intéressante, le sérum de patients BPCO Ap-REE semble promouvoir l'expression de marqueurs de la différenciation et de PGC1 α , ce qui pourrait traduire un potentiel effet compensateur (Fig.3). Enfin, le sérum des patients BPCO Ap-REE induit une élévation de l'expression de la myostatine dans les myotubes sains (Fig.4). L'ensemble de ces résultats (voir tableau 4) suggèrent que le REE n'a pas permis d'apporter de bénéfices à la composition du sérum des patients et que, *in vivo*, le microenvironnement BPCO de la cellule musculaire continuerait de promouvoir des altérations dans les processus de différenciation / régénération musculaire.

Tableau 4 : Comparaison des effets induits par les séra Av-/Ap-REE de sujets sains et de patients BPCO sur la différenciation des myotubes sains

	Séra de sujets sains	Séra de patients BPCO
Morphologie cellulaire		
Diamètre	↑*	=
Dégradation protéique (UPS)		
MuRF1	=	↑*
Atrogin1	=	↑*
Nedd4	=	=
Dégradation protéique (Autophagie)		
SQSTM/p62	=	↑*
AMBRA1	=	↑*
GABARAPL1	↑	↑
UVRAG	=	↑
BNIP3	=	=
BNIP3L	=	=
Signalisation dégradation protéique		
pNFκB/NFκB	=	=
FoxO1	=	↑*
FoxO3	=	↑*
Synthèse protéique		
IGF1	=	=
pAkt/Akt	=	=
mTOR	=	=
Différenciation / Régénération		
MyoD	=	↑*
Myf5	=	↑
MyoG	=	=
Myostatin	=	↑*
PGC1α	=	↑

* : significative ; ↑ : augmentation ; ↓ : diminution ; = aucune variation

Le sérum de patients BPCO Ap-REE n'induit pas d'augmentation du diamètre des myotubes contrairement au sérum sains Ap-REE

A notre connaissance, c'est la première fois que les répercussions du REE sur la circulation systémique sont testées expérimentalement sur la différenciation de myotubes humains. Il apparaît que le REE n'a pas permis d'améliorer la composition du sérum des patients, puisque l'on constate qu'à l'inverse d'une augmentation du diamètre des myotubes observés dans les myotubes exposés à du sérum SHS Ap-REE, les myotubes exposés à du sérum de patients Ap-REE ont vu leur diamètre diminuer (Fig.1). Cet effet opposé du

sérum Ap-REE entre les conditions saine et pathologique semble appuyer le fait que le REE ne permette de rectifier que partiellement le stress oxydant circulant^{204,207,468}. De plus, le REE n'ayant à ce jour aucun effet sur l'inflammation systémique, il est probable que l'inflammation résiduelle verrouille de potentiels effets bénéfiques du REE sur le stress oxydant et participe ainsi au maintien d'un microenvironnement délétère^{476,477}.

Il est important de souligner que comparativement à l'étude 3, bien que l'amplitude des effets soit plus importante, nous retrouvons un effet similaire du sérum de patient Av-REE par rapport au sérum de sujets sains Av-REE, entraînant une augmentation du diamètre des myotubes sains (Fig.1A). Sur la base de la même hypothèse, il est possible que le rôle bénéfique basal du sérum de patients soit véhiculé par la présence de molécules pro-régénératives en réponse à des facteurs inflammatoires et oxydants dans la circulation systémique des patients. Cette hypothèse est d'autant plus envisageable que, bien que l'échelle de sévérité utilisée dans chacune des deux études diffère (GOLD vs BODE), les patients de cette étude (BODE 4) et les patients sévères de l'étude 3 (GOLD IV) présentent des caractéristiques cliniques proches. En effet, les patients de cette étude présentent un déclin important de la valeur du VEMS prédit ($38,5 \pm 12$ vs $24 \pm 4\%$ _{préd} pour l'étude 3) et une réduction des capacités à l'effort comparable aux sujets de l'étude 3 (406 ± 93 vs 340 ± 54 m pour l'étude 3). Ces légères différences dans le VEMS et le TDM6 peuvent être attribuées au fait que les patients de cette étude sont plus jeunes de 2,2 ans en moyenne par rapport à ceux de l'étude 3 ($59,8 \pm 10,4$ ans vs $62 \pm 3,4$ ans pour l'étude 3).

Le sérum de patients BPCO Ap-REE active les voies du catabolisme protéique

De manière intéressante, associée à la réduction du diamètre des myotubes, le sérum de patients BPCO Ap-REE induit une augmentation de l'expression de plusieurs marqueurs de la dégradation protéique par la voie du système UPS (Fig.2A). Ces résultats semblent en accord avec l'étude de *Vogiatzis et coll*, qui avaient montré une surexpression des enzymes MuRF1 et Atrogin1 chez des patients BPCO cachectiques à la suite d'un REE¹¹⁷, ce qui pourrait indiquer une origine systémique de cette activation de la voie UPS.

Parallèlement, nos résultats indiquent l'activation des voies de dégradation dépendantes de l'autophagie. On remarque ainsi que le sérum de patients BPCO Ap-REE induit une activation globale de cette voie catabolique, et particulièrement la surexpression de AMBRA1 et SQSTM/p62 (Fig.2B). L'implication d'un processus d'hyper-autophagie induit par le sérum de patients BPCO est d'autant plus probable que SQSTM/p62 avait déjà

été montré comme étant surexprimé dans les biopsies et les cultures primaires musculaires de patients BPCO^{118,119}.

La surexpression de FoxO1 et FoxO3 semble conforter notre hypothèse que le microenvironnement des patients contient des facteurs circulants à l'origine d'un stress capable d'activer les voies conjointes de dégradation UPS et autophagique⁴⁷⁸ (Fig.3C). Ces résultats font ainsi écho à une récente étude montrant que les patients qui répondent le moins au REE présentent notamment de faibles adaptations des voies de signalisation autophagique⁴⁷⁹.

En revanche, nos résultats n'indiquent pas d'activation des voies de la synthèse protéique (Fig.3D), ce qui pourrait également être un élément soulignant un trouble du métabolisme des acides aminés. De manière physiologique, suite à un exercice, la balance nette entre les processus de synthèse et de dégradation protéique est déséquilibrée en faveur de la dégradation. Ce mécanisme transitoire est modulé par l'entraînement, de sorte que le déséquilibre entre synthèse et dégradation protéique post-exercice est moins important chez une personne entraînée⁴⁸⁰⁻⁴⁸². De manière similaire au stress oxydant induit par l'exercice, ce processus est altéré chez les patients BPCO, et pourrait notamment être dû à un défaut du métabolisme intermédiaire des acides aminés⁴⁸³⁻⁴⁸⁵. Associé au fait que les patients souffrent de déperditions énergétiques¹⁶¹ et de nombreuses altérations de l'ultrastructure musculaire^{379,380}, il est possible que le métabolisme des acides aminés soit un élément limitant dans les processus de régénération musculaire, et que l'ingestion et l'incorporation d'acides aminés soient insuffisantes pour favoriser les adaptations bénéfiques en réponse au REE. L'ensemble de ces éléments s'ajoutent à la liste des déséquilibres moléculaires systémiques que le REE échoue à rétablir.

Le sérum de patients BPCO Ap-REE pourrait induire une réponse compensatoire des cellules sur les marqueurs de la différenciation

En accord avec l'hypothèse émise dans l'étude 3, l'effet pro-catabolique du sérum de patients BPCO Ap-REE semble induire un effet compensateur dans les myotubes sains sur l'expression de marqueurs de la différenciation. En effet, la surexpression de MyoD et Myf5 (Fig.3A) semble indiquer que le sérum BPCO Ap-REE favorise la différenciation des myotubes sains, en réponse à ses effets sur l'expression des marqueurs du système UPS et de l'autophagie. Ces résultats confortent ainsi l'hypothèse d'un épuisement du potentiel myogénique des cellules satellites chez les patients BPCO¹²². De plus, la tendance du sérum de patients BPCO Ap-REE à induire l'expression de PGC1 α (Fig.3B) suggère

également que l'effet compensateur pourrait également passer par la persistance d'une élévation des ROS systémiques, comme cela a déjà été montré dans plusieurs études^{117,204,206,445,448,476}.

Le REE pourrait avoir un effet bénéfique sur la myostatine circulante

Concernant l'expression de la myostatine, de manière similaire à l'étude 3, nous avons observé que le sérum de patients BPCO à l'état basal induit une répression de l'expression de la myostatine (Fig.4A). Etant donné le caractère autorégulateur de la myostatine sur sa propre expression, il est envisageable qu'à l'état basal, le niveau plus faible d'expression de la myostatine dans les myotubes exposés à du sérum de patients BPCO Av-REE traduise un niveau élevé de myostatine dans le sérum de ces patients, comme cela a déjà été montré dans plusieurs études^{446,486}.

Similairement, alors que le sérum de sujets sains Ap-REE n'a pas entraîné de modification de l'expression de la myostatine dans les myotubes exposés, le sérum de patients BPCO AP-REE a, quant à lui, rétablit un niveau d'expression de la myostatine comparable à celui des myotubes exposés à du sérum de sujets sains Ap-REE (Fig.4A). L'analyse des variations confirme d'ailleurs cette élévation de l'expression de la myostatine uniquement dans les myotubes exposés à du sérum de patients BPCO Ap-REE (Fig.4B). Cependant, une fois encore, le niveau d'expression de la myostatine étant autorégulé, cette hausse de l'expression pourrait en fait traduire une baisse de la concentration sérique de la myostatine. Ainsi, le REE chez les patients BPCO pourrait permettre de rétablir une concentration sérique en myostatine équivalente à celle des sujets sains. A notre connaissance, aucune étude ne s'est intéressée à la concentration sérique en myostatine après une réhabilitation pulmonaire. En revanche, bien que la taille des effets induits soit variable, plusieurs études ont déjà montré une réduction de l'expression de myostatine au niveau musculaire après un REE chez des patients BPCO^{487,488}, suggérant un effet bénéfique du REE. Il est donc probable que si le REE rétablit l'expression de la myostatine au niveau musculaire, il est susceptible de rétablir également son expression au niveau de la circulation systémique. Ainsi, dans la présente étude, le fait que les myotubes exposés à du sérum de patients BPCO Ap-REE aient un niveau d'expression de myostatine équivalent à celui des myotubes exposés à du sérum sain Ap-REE pourrait indiquer que le REE a eu un effet bénéfique sur la concentration en myostatine sérique. La vérification de cette hypothèse nécessite cependant de doser la myostatine sérique des échantillons ayant servi aux expérimentations.

Limites :

Associé à l'étude 3, l'ensemble de ces résultats confortent l'idée que le microenvironnement BPCO joue un rôle primordial dans les processus de différenciation/régénération des cellules musculaires. Si ces résultats indiquent que le REE, à travers la circulation, semble avoir des effets différentiels entre sujets sains et patients BPCO, un dosage global des marqueurs sériques est nécessaire afin d'identifier les acteurs pouvant être impliqués dans ces effets opposés. Entre autre, le dosage de cytokines inflammatoires ou de marqueurs tel que le TNF α ou l'IFN γ confirmerait l'inefficacité du REE sur le « *Spill-over* » de molécules pro-inflammatoires et justifierait que l'exposition des myoblastes sains à du sérum de patients post-REE active des voies du catabolisme^{97,122,214}. Similairement, la présence de microARN spécifiques^{121,331,489} ou de protéines de stress^{490,491} dans le sérum pourrait être à l'origine de la surexpression des enzymes MuRF1 et Atrogin1, et ainsi promouvoir des processus atrophiques. Cependant, il apparaît également nécessaire de s'intéresser aux facteurs pro-régénératifs également contenus dans les échantillons sériques et qui pourraient indiquer une compensation de l'organisme pour répondre aux signaux pro-atrophiques du sérum.

V. Conclusion :

Nous pouvons conclure que le REE n'a pas permis d'améliorer la composition du sérum des patients BPCO de sorte que, comparé aux effets du sérum de sujets sains Ap-REE, les myoblastes exposés au sérum de patients BPCO Ap-REE n'ont pas formé de myotubes de plus gros diamètre. Cet effet différentiel est potentiellement dû au fait que le sérum de patients BPCO Ap-REE induit la surexpression de marqueurs pro-cataboliques dans les myotubes exposés. En réponse, un effet compensatoire induit la surexpression de facteurs de la différenciation dans les myotubes exposés au sérum BPCO Ap-REE. Nos résultats suggèrent également que le REE permet de rééquilibrer la quantité de myostatine circulante dans le sérum de patients BPCO. Nos résultats confirment ainsi que le sérum des patients BPCO altère les processus de différenciation musculaire, suggérant que le microenvironnement musculaire peut limiter les effets bénéfiques induits par le REE chez le patient BPCO.

Etude 5 : L'électrostimulation *in vitro* révèle les défauts d'adaptation musculaire des myotubes de patients BPCO induits par l'exercice

I. Introduction :

La dysfonction musculaire est un problème de premier ordre dans la BPCO à l'origine d'un déclin de la qualité de vie et d'un mauvais facteur pronostic de survie^{72,74}. La RR est à ce jour la stratégie thérapeutique la plus efficace pour les malades respiratoires chroniques²³². Au regard des connaissances que nous avons sur les bénéfices de l'activité physique régulière notamment sur l'humeur, les fonctions cognitives ou encore le métabolisme⁴⁹², le REE est l'une des composantes majeures de la thérapie²³⁴. Bien que recommandable à toutes les étapes du parcours de santé du patient pour maintenir ou rétablir une tolérance à l'effort, cette approche souffre cependant de quelques limites dans les bénéfices générés, comme nous l'avons vu dans l'étude précédente.

D'une part, un pourcentage non-négligeable (environ 35%) de patients ne répond pas aux effets bénéfiques de la RR²⁶⁵. D'autre part, pour les patients répondant positivement à la thérapie, l'amplitude des effets est réduite comparativement à des sujets sains^{266,267} et ceux-ci s'estompent dans le temps malgré les efforts fournis au cours de programmes de maintenance^{268,333}. Plusieurs stratégies de supplémentation nutritionnelle et pharmacologique ont été envisagées afin de parer à des carences et pour amplifier les adaptations induites par l'exercice. Malheureusement, peu d'études ont pu montrer des effets bénéfiques additionnels de ces supplémentations par rapport aux gains fonctionnels relatifs au REE^{155,242-244,269,270}. L'origine de ces limitations reste encore mal connue et, en tenant compte des contraintes réglementaires relatives à l'expérimentation humaine de plus en plus contraignantes, la mise en place de nouvelles approches expérimentales permettrait d'améliorer notre compréhension des mécanismes impliqués et ainsi d'optimiser le REE.

Depuis le milieu des années 70, les progrès dans la modélisation et l'étude de processus *in vitro* et dans l'ingénierie tissulaire ont permis d'élaborer des approches susceptibles de modéliser le REE⁴⁹³. Parmi ces approches, la stimulation électrique *in vitro* (*Electrical Pulse Stimulation* - EPS) permet de modéliser les mécanismes d'adaptation musculaire liés à l'activité physique, voire même à l'entraînement. Malgré l'absence de consensus et la très grande pluralité des protocoles utilisés dans la littérature³⁷³, il semblerait qu'un pattern d'EPS *in vitro* à basse fréquence ($\leq 5\text{Hz}$), durant une période longue (24 à 48h), puisse s'approcher d'un entraînement *in vivo* en endurance, alors qu'un pattern à haute fréquence ($> 30\text{Hz}$) et de courte durée ($< 8\text{h}$) est plutôt associé à un exercice en force^{373,374}. Bien que le parallèle entre électrostimulation *in vitro* et entraînement *in vivo* reste complexe, *Burch et coll* ont cependant montré une bonne correspondance dans l'expression de PGC1 α et des protéines contractiles MHCI et MHCIIx entre des cellules

C2C12 stimulées selon un *pattern* d'électrostimulation chronique à faible intensité et des souris ayant suivi un entraînement en endurance⁴⁹⁴.

L'ensemble de ces données indique que, selon le protocole, il est possible d'induire une réponse adaptative des cellules musculaires *in vitro* comparable aux adaptations induites par l'exercice *in vivo*. Ceci permet d'envisager deux applications dans les cultures primaires issues de patients BPCO : l'étude de défauts d'adaptation à l'effort et l'identification d'un sécrétome pathologique spécifique.

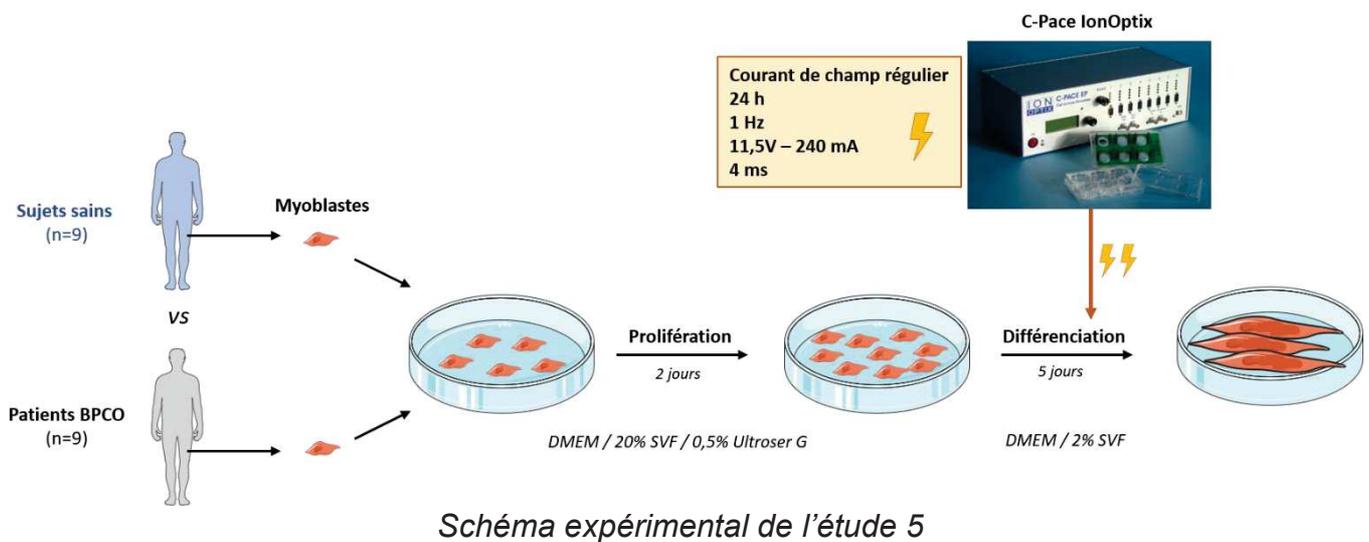
En tenant compte du fait que la culture primaire permet de préserver des traits physiopathologiques acquis dans le cadre de la BPCO^{119,202,203,493}, l'utilisation de protocoles d'EPS pourrait permettre d'identifier des anomalies d'adaptation en réponse à l'exercice comme observées dans les myotubes de patients diabétiques³⁷⁷ ou souffrant du syndrome de fatigue chronique³⁷¹. L'hypothèse de cette étude est que les myotubes de patients BPCO présentent des anomalies dans la réponse à l'EPS. L'objectif est donc de comparer les adaptations induites par l'EPS entre des myotubes issus de sujets sains ou de patients BPCO. Confirmer l'existence d'une réponse différentielle dans les myotubes BPCO pourrait ainsi constituer une nouvelle piste de recherche des mécanismes impliqués dans la réduction des bénéfices liés au REE.

II. Procédure expérimentale :

Comme illustré dans le schéma expérimental ci-après, nous avons cultivé des myoblastes provenant de 9 sujets sains et 9 patients BPCO (caractéristiques dans le tableau 1) dans un milieu de prolifération (DMEM / 20% SVF / Ultrosér G), puis induit leur différenciation en les exposant à un milieu de différenciation (DMEM / 2% SVF) (voir fiche technique n°7 « Culture primaire de myoblastes humains »). Au 4^{ème} jour de différenciation, le milieu de différenciation est renouvelé et le protocole de stimulation est entamé durant 24h à 1Hz et 11,5V, comme décrit dans la fiche technique n°8 « Electrostimulation *in vitro* ».

A l'issue des 24h d'électrostimulation, les myotubes sont préparés afin d'être imagés selon la procédure décrite par la fiche technique n°7 « Immunofluorescence des myotubes et analyses de la morphologie cellulaire ». Trois paramètres sont évalués : le diamètre des myotubes, l'index de fusion (IdF) et la surface recouverte par les myotubes.

D'autre part, les ARN et protéines sont extraits selon les procédures décrites dans la fiche technique n°8 « Extraction et purification des protéines et ARN totaux », afin d'analyser l'expression des différents marqueurs par qPCR et *Western Blot*, respectivement. L'ensemble des procédures relatives à ces deux méthodes, aux séquences d'amorces et aux anticorps utilisés sont décrites dans les fiches techniques n°9 « RT-qPCR » et n°10 « SDS-PAGE et *Western Blot* ».



III. Résultats :

Caractéristiques basales des sujets sains et patients BPCO :

Les caractéristiques basales des sujets sains et patients BPCO dont les cellules ont été utilisées pour les expérimentations sont décrites dans le tableau 1. Les patients BPCO présentent des troubles de la composition corporelle comme l'indiquent la tendance à la baisse de l'IMM ($p=0,11$) et l'IMC plus faible chez les patients BPCO ($p=0,006$), associés à une faiblesse musculaire ($p=0,0011$) et une réduction de la tolérance à l'effort au TDM6 ($p=0,003$).

Tableau 1 : Caractéristiques des sujets sains et patients BPCO dont sont issues les cellules électrostimulées

	Sujets sains (n=9)	Patients BPCO (n=9)	Significativité
Age (années)	62,3±6,4	58,0±6,5	0,18
Sexe (H/F)	7/2	6/3	-
VEMS (L)	3,25±0,7	1,06±0,5	<0,001
(% _{préd})	102,4±14,7	36,3±14,6	<0,0001
IMC (kg/m ²)	25,5±3,6	20,5±3,1	0,006
IMM (kg/m ²)	18,5±2,0	16,7±2,2	0,11
FMVq (kg)	36,5±9,7*	18,0±6,9°	0,0011
TDM6 (m)	633±33	440±136	0,003
(% _{préd})	93,4±11,8	62,5±16,3	0,0003

IMC : Indice de masse corporelle, IMM : Indice de masse maigre, FMVq : Force maximale volontaire du quadriceps, VEMS : Volume expiré maximal en 1 seconde, TDM6 : Test de marche de 6 minutes

*une donnée manquante

°deux données manquantes

L'EPS induit l'atrophie des myotubes de patients BPCO

Nous avons analysé l'impact de l'EPS sur la morphologie cellulaire, et notamment sur le phénomène d'hypertrophie. D'une part, à l'état basal, nous observons que les myotubes BPCO sont plus fins que les myotubes sains ($p < 0.0001$) (Fig.1A). D'autre part, nous avons constaté que l'EPS a des effets opposés sur les myotubes sains et BPCO (Effet d'interaction : $p = 0,003$). En effet, tandis que le diamètre des myotubes sains a tendance à augmenter (Av/Ap-EPS : $47 \pm 7,2$ vs $48,6 \pm 8,3$ μm , $p = 0,06$), le diamètre des myotubes BPCO a, quant à lui, été réduit de 7,1% après l'EPS (Av/Ap-EPS : $40,9 \pm 8,1$ vs $38 \pm 6,5$ μm , $p = 0,0054$) (Fig.1A). Cette divergence d'effet entre les deux types de cellules est d'autant plus visible lorsque l'on analyse les effets de l'EPS pour chaque culture primaire de sujets. En effet, on constate qu'en moyenne l'EPS a induit une augmentation du diamètre des myotubes sains de $3,8 \pm 9,4\%$, contre une réduction du diamètre des myotubes BPCO de $4,6 \pm 4,0\%$ ($p = 0,031$) (Fig.1B).

L'analyse en fréquence de distribution montre que les myotubes BPCO sont plus fins que les myotubes sains. En effet, la pente initiale plus importante de la courbe relative aux myotubes BPCO non-électrostimulés indique une plus grande proportion de myotubes de petit diamètre (<50 μm) que dans les cultures primaires saines non-électrostimulées. Il en résulte que la courbe des fréquences relatives cumulées associée aux myotubes BPCO arrive plus rapidement à sa phase de plateau, indiquant que la proportion de myotubes de taille intermédiaire et de grande taille ($\geq 50 \mu\text{m}$) est moins importante dans les cultures primaires de myotubes de patients. D'autre part, l'analyse en fréquence de distribution cumulée relative confirme la différence d'effet de l'EPS entre les myotubes SHS et BPCO. On peut constater que la courbe relative aux myotubes BPCO électrostimulés est au-dessus de celle correspondant aux myotubes BPCO non-stimulés, ce qui suggère que les myotubes BPCO sont plus fins après EPS ($p=0,027$) (Fig.1C). On constate également que, bien que l'effet ne soit pas significatif, l'EPS a eu un effet inverse sur les myotubes sains avec un *shift* vers des myotubes de diamètre plus important (Fig.1C).

De manière très intéressante, les résultats relatifs à l'index de fusion présentent des profils similaires, avec un effet opposé de l'EPS entre les myoblaste sains et BPCO (effet d'interaction : $p=0,019$). En effet, l'EPS a tendance à augmenter l'index de fusion des myotubes sains (Av/Ap-EPS : $50,6\pm 10$ vs $52,9\pm 11\%$, $p=0,087$) et à le réduire pour les myotubes BPCO (Av/Ap-EPS : $47,1\pm 9,1$ % vs $44,6\pm 8,4$ %, $p=0,06$) (Fig.1D). L'amplitude de ces variations semblent correspondre aux précédentes analyses relatives aux diamètres des myotubes, avec une augmentation moyenne de $4,4\pm 7,0\%$ de l'index de fusion des myotubes sains contre une réduction de $4,9\pm 8,4\%$ pour les myotubes BPCO ($p=0,043$) (Fig.1E).

Les résultats relatifs à la surface occupée par les myotubes suivent le même schéma que celui du diamètre des myotubes, avec une augmentation de la surface recouverte par les myotubes sains et une réduction de celle occupée par les myotubes BPCO après EPS (SHS Av/Ap-EPS : $27,2\pm 6,6$ vs $28,1\pm 8,1\%$ - BPCO Av-Ap-EPS : $25,4\pm 5,2$ vs $22,9\pm 6,6\%$, effet d'interaction $p=0,044$) (Fig.1F). L'analyse individuelle des variations induites par l'EPS montre également que l'EPS augmente la surface occupée par les myotubes sains et réduit celle occupée par les myotubes BPCO ($+4,5\pm 8,2\%$ vs $-5,3\pm 8,9\%$, $p=0,0098$) (Fig.1G). L'ensemble de ces résultats montrent donc une réponse opposée des myotubes BPCO à l'EPS comparés aux myotubes sains concernant les caractéristiques morphologiques des myotubes.

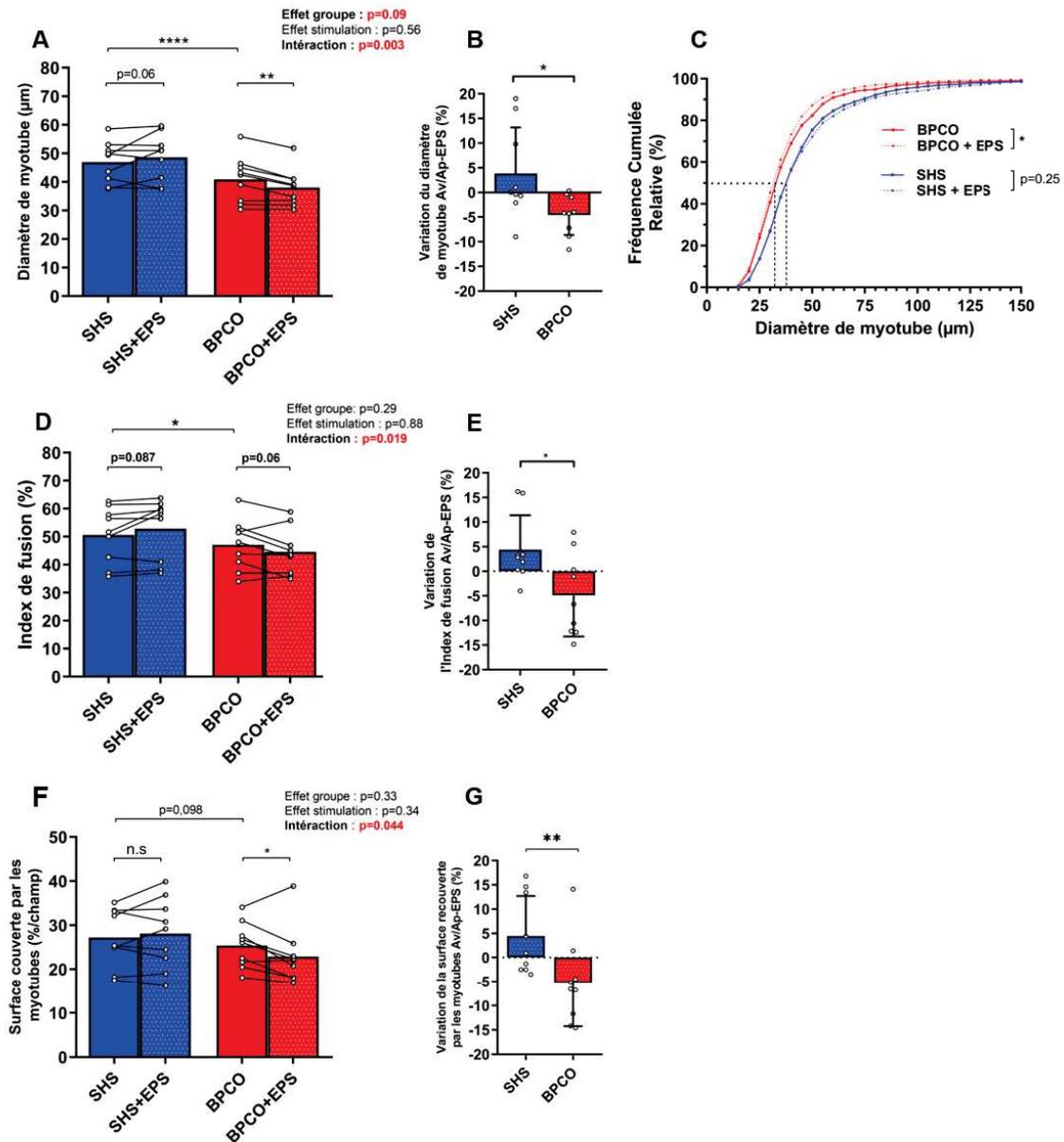


Figure 1 : Effets de l'EPS sur la morphologie des myotubes sains et BPCO : (A) Quantification du diamètre des myotubes et (B) des variations du diamètre des myotubes induites par 24h d'électrostimulation dans les cultures primaires de 9 sujets sains et de 9 patients BPCO (les effets induits sont exprimés en pourcentage de variation par rapport à la condition non-électrostimulée). (C) Analyses en fréquence de distribution cumulées relatives des diamètres des myotubes des mêmes cultures primaires. Quantification de (D) l'index de fusion et (E) des variations induites par l'électrostimulation dans les mêmes cultures primaires. (F) Quantification de la surface couverte par les myotubes et (G) des variations induites par l'électrostimulation dans les mêmes cultures primaires. Les effets d'interaction, de stimulation et de groupe ont été évalués avec une ANOVA deux voies à mesures répétées. (*) et (**) indiquent respectivement une différence significative à $p<0,05$ et $p<0,01$ au test de Mann-Whitney pour les analyses de variations ou au test de distribution de Kolmogorov-Smirnov pour l'analyse des fréquences de distribution cumulées.

L'EPS induit la surexpression de MuRF1 dans les myotubes sains et BPCO

Afin d'explorer les mécanismes impliqués dans ces phénomènes atrophiés induit par l'EPS dans les myotubes BPCO, nous nous sommes intéressés à l'expression des enzymes du système UPS et notamment aux E3-ligases MuRF1 et Atrogin1. A l'état basal, bien que les niveaux d'expression ne soient pas significativement différents, on constate que l'expression de MuRF1 et d'Atrogin1 a tendance à être plus élevée dans les myotubes BPCO (MuRF1 : $0,443 \pm 0,155$ vs $0,590 \pm 0,319$ u.a, $p=0,24$, Fig.2A – Atrogin1 : $0,695 \pm 0,220$ vs $0,873 \pm 0,234$ u.a, $p=0,07$, Fig.2C). Suite à l'EPS, nous observons une augmentation significative de l'expression de MuRF1 à la fois dans les myotubes sains et malades (effet stimulation : $p=0,049$, Fig.2A). Bien que l'augmentation de l'expression de MuRF1 a tendance à être plus importante dans les myotubes sains ($+41,9 \pm 32,2$ % vs $+17,7 \pm 27,8$ %, $p=0,09$; Fig.2B), cette différence est principalement attribuable au fait que l'expression de MuRF1 est plus faible au niveau basal dans les myotubes sains. On ne constate en revanche pas de variation de l'expression de Atrogin1 suite à l'EPS (Fig.2D).

Conformément à la littérature, l'EPS a induit l'expression d'enzymes de la dégradation dans le but de préserver l'homéostasie protéique en réponse aux dégâts de l'EPS. Cependant, ces phénomènes pourraient être impliqués dans un déséquilibre entre dégradation et synthèse protéique sous-jacent aux phénomènes atrophiés observés.

L'induction de la synthèse protéique par l'EPS est émoussée dans les myotubes BPCO

Afin de statuer sur un déséquilibre potentiel de la dynamique protéique induit par l'EPS dans les myotubes BPCO, nous nous sommes intéressés à l'activité de la synthèse protéique *via* l'analyse du ratio pAkt/Akt et de l'expression de mTOR. Le ratio pAkt/Akt basal est significativement plus bas dans les myotubes BPCO ($0,742 \pm 0,232$ vs $0,467 \pm 0,146$ u.a, $p=0,032$; Fig.3A) ce qui indique une sous-activation basale de la synthèse protéique pour les myotubes BPCO, comme observé dans une précédente étude²⁰². Nous n'observons en revanche pas de différence significative quant à l'expression basale de mTOR entre les myotubes BPCO et les myotubes sains non-stimulés ($0,820 \pm 0,066$ vs $0,923 \pm 0,205$ u.a, $p=0,24$; Fig.3C).

De manière intéressante, l'EPS a des effets différentiels entre les myotubes sains et BPCO. En effet, alors que la stimulation induit une élévation du ratio pAkt/Akt similaire entre les deux types de myotubes ($+48,2 \pm 94,3$ vs $48,9 \pm 49,8\%$, $p=0,48$; Fig.3C), nous constatons que l'expression de mTOR augmente uniquement dans les myotubes sains ($+29,7 \pm 26,5$ vs $+0,90 \pm 8,2\%$, $p=0,011$; Fig.3D). Ces résultats suggèrent donc que l'initiation de la synthèse protéique est émoussée dans les myotubes BPCO, ce qui confirme la présence d'un déséquilibre dans l'homéostasie protéique induite par l'EPS entre les myotubes BPCO et sains.

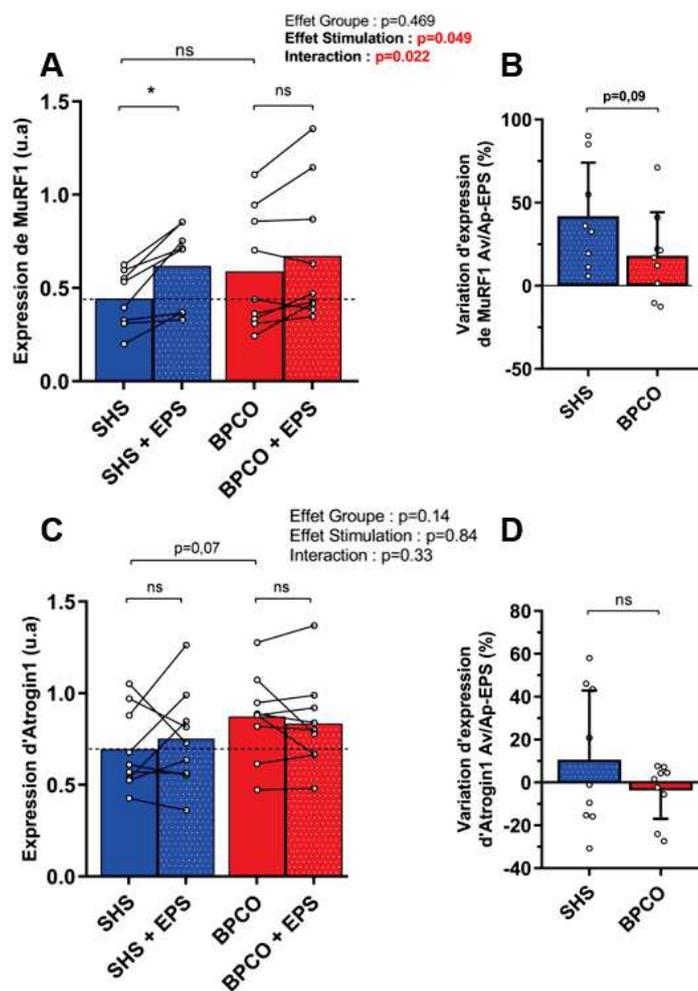


Figure 2 : Effets de l'EPS sur l'expression de MuRF1 et Atrogin1 dans les myotubes sains et BPCO : (A) Quantification et (B) variations de l'expression de MuRF1 dans les myotubes électrostimulés ou non de 9 sujets sains et 9 patients BPCO. (C) Quantification et (D) variation d'expression d'Atrogin1 dans les mêmes cultures primaires. Les effets d'interaction, de stimulation et de groupe ont été évalués avec une ANOVA deux voies à mesures répétées. Le test de Mann-Whitney n'a indiqué aucune différence significative concernant les variations d'expression des deux marqueurs en réponse à l'EPS.

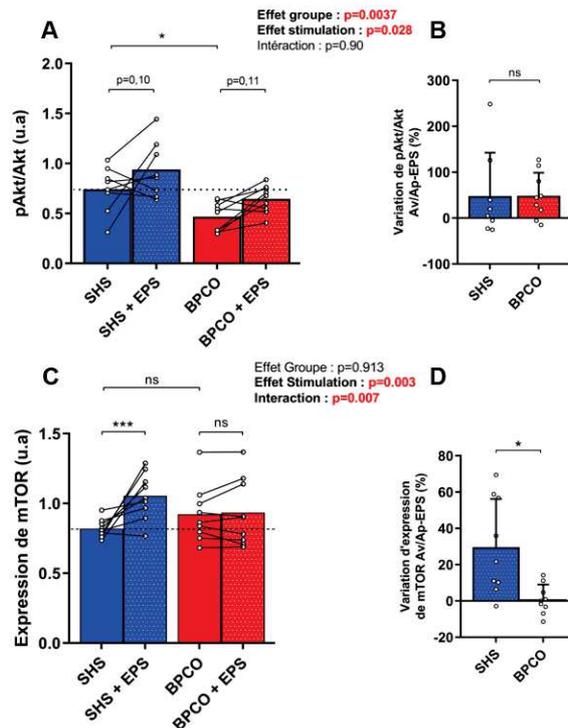


Figure 3 : Effets de l'EPS sur le ratio pAkt/Akt et l'expression de mTOR dans les myotubes sains et BPCO : (A) Quantification et (B) variations du ratio pAkt/Akt dans les myotubes électrostimulés ou non de 9 sujets sains et 9 patients BPCO. (C) Quantification et (D) variation d'expression de mTOR dans les mêmes cultures primaires. Les effets d'interaction, de stimulation et de groupe ont été évalués avec une ANOVA deux voies à mesures répétées. (*) indique une différence significative à $p < 0,05$ au test de Mann-Whitney.

L'EPS a tendance à stimuler l'expression de MyoD uniquement dans les myotubes sains

En parallèle de la balance protéique, nous nous sommes intéressés à l'impact de l'EPS sur l'expression des marqueurs de la différenciation, MyoD et MyoG. A l'état basal, nous n'observons aucune différence dans l'expression des deux marqueurs entre les myotubes sains et BPCO (Fig.4A & C). En revanche nous observons des variations d'expression induites par l'EPS spécifiques à chaque marqueur. L'EPS n'induit une élévation de l'expression de MyoD que dans les myotubes sains (SHS Av/Ap-EPS : $0,640 \pm 0,170$ vs $0,738 \pm 0,205$ u.a – BPCO Av/Ap-EPS : $0,636 \pm 0,346$ vs $0,591 \pm 0,290$ u.a, effet d'interaction $p = 0,007$; Fig.4A). L'analyse des variations individuelles met d'ailleurs en évidence l'absence d'effet de la stimulation électrique sur l'expression de MyoD dans les myotubes BPCO ($+19,3 \pm 29,7$ % vs $-4,2 \pm 15,2$ %, $p = 0,06$; Fig.4B).

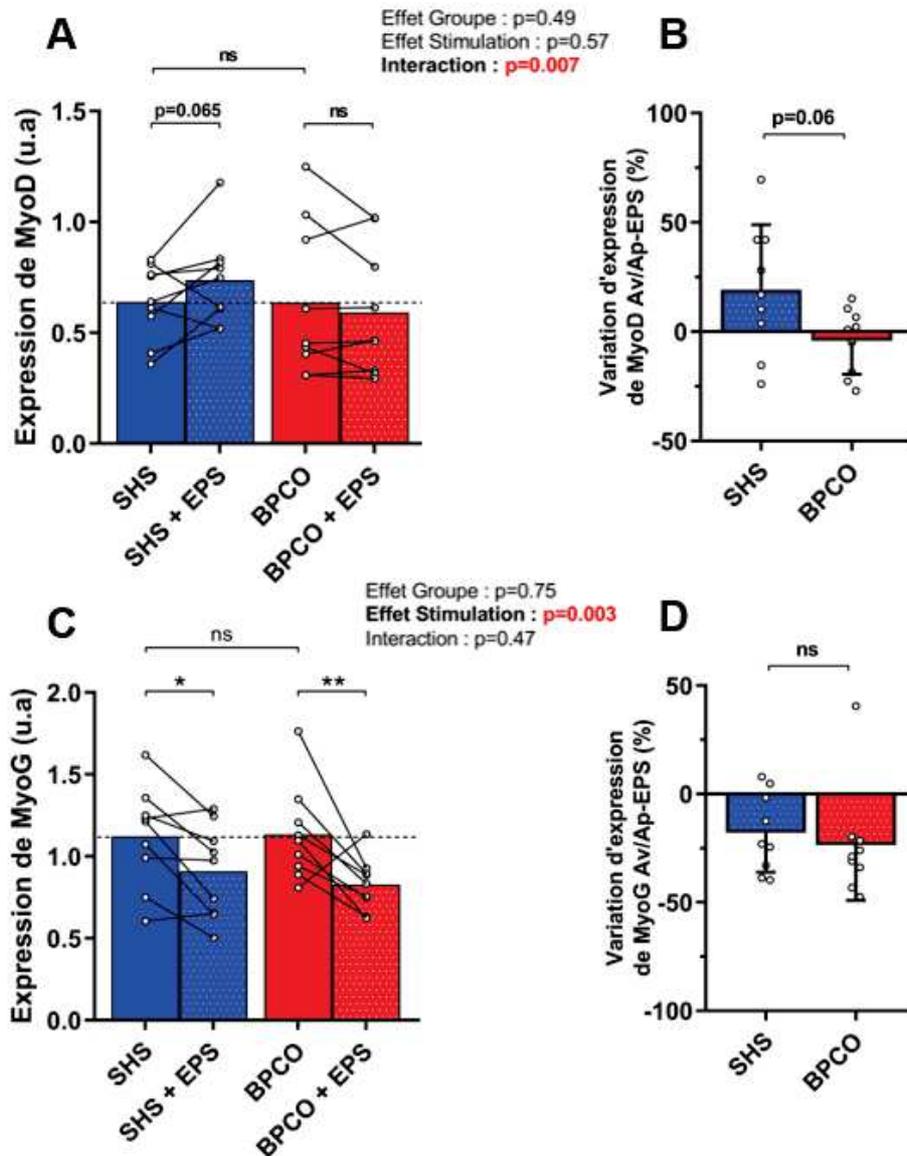


Figure 4 : Effets de l'EPS sur l'expression de MyoD et MyoG dans les myotubes sains et BPCO : (A) Quantification et (B) variations d'expression de MyoD dans les myotubes électrostimulés ou non de 9 sujets sains et 9 patients BPCO. (C) Quantification et (D) variation d'expression de MyoG dans les mêmes cultures primaires. Les effets d'interaction, de stimulation et de groupe ont été évalués avec une ANOVA deux voies à mesures répétées. Le test de Mann-Whitney n'a indiqué aucune différence significative concernant les variations d'expression des deux marqueurs en réponse à l'EPS.

Concernant les effets de l'EPS sur l'expression de MyoG, on constate une réduction comparable de l'expression de MyoG entre les myotubes sains et BPCO (SHS Av/Ap-EPS : $1,122 \pm 0,309$ vs $0,909 \pm 0,2821$ u.a, $p=0,041$ – BPCO Av/Ap-EPS : $1,133 \pm 0,289$ vs $0,827 \pm 0,160$ u.a, $p=0,008$; effet stimulation $p=0,003$; Fig.4C). D'autre part, l'amplitude de la réduction d'expression de MyoG est équivalente entre les myotubes sains et BPCO ($-17,8 \pm 18,3$ vs $23,4 \pm 25,7\%$, $p=0,39$; Fig.4D). L'ensemble de ces résultats indique que l'EPS semble avoir des effets différentiels sur l'expression de MyoD, mais pas sur MyoG, suggérant une altération de l'induction de la différenciation dans les myotubes BPCO suite à l'EPS.

L'adaptation oxydative à l'EPS est réduite dans les myotubes BPCO

Le programme d'EPS employé dans cette étude étant reconnu pour induire des adaptations associées au métabolisme oxydatif, nous avons évalué ses effets sur la quantité de myosine lourde de type I (MHC1) et sur l'expression de PGC1 α . A l'état basal, bien que la différence ne soit pas significative, les myotubes BPCO non-stimulés semble contenir moins de MHC1 que les myotubes sains ($0,487 \pm 0,134$ vs $0,388 \pm 0,156$ u.a, Fig.5A), mais l'EPS amplifie cette différence avec un effet contraire sur l'expression de MHC1 (SHS Av/Ap : $0,487 \pm 0,134$ vs $0,582 \pm 0,139$ u.a, $p=0,03$ – BPCO Av /Ap-EPS : $0,388 \pm 0,156$ vs $0,338 \pm 0,103$ u.a, $p=0,21$; effet d'interaction $p=0,024$; Fig.5A). Nous avons ainsi mesuré une augmentation individuelle de $20,8 \pm 17,0\%$ de la quantité de MHC1 dans les myotubes sains, contre une réduction de $10,1 \pm 14,2\%$ dans les myotubes BPCO ($p=0,032$; Fig.5B).

Cette différence, concernant la quantité de MHC1 produite dans les myotubes BPCO, semble souligner un défaut d'adaptation au métabolisme oxydative en réponse à l'EPS, un défaut également observé sur les variations d'expression de PGC1 α . En effet, bien que nous n'ayons pas relevé de différence significative sur l'expression basal de PGC1 α ($p=0,78$; Fig.5C) et que l'EPS induit la surexpression de PGC1 α dans chaque type de myotube (SHS Av/Ap-EPS : $0,405 \pm 0,164$ vs $0,880 \pm 0,342$ u.a ; $p=0,0001$ – BPCO Av/Ap-EPS : $0,460 \pm 0,409$ vs $0,726 \pm 0,656$ u.a, $p=0,013$; effet stimulation $p=0,0008$; Fig.5C), l'amplitude des effets induits semble différente. L'analyse individuelle montre en effet que l'EPS induit une augmentation de l'expression de PGC1 α plus de 2,5 fois supérieure dans les myotubes sains comparée aux myotubes BPCO ($+126,0 \pm 63,2$ vs $+49,7 \pm 45,8\%$, $p=0,014$; Fig.5D). L'ensemble de ces résultats fait écho aux défauts de synthèse protéique relevés dans les myotubes BPCO en réponse à l'EPS, en montrant que les myotubes BPCO présentent un défaut d'adaptation du métabolisme oxydatif.

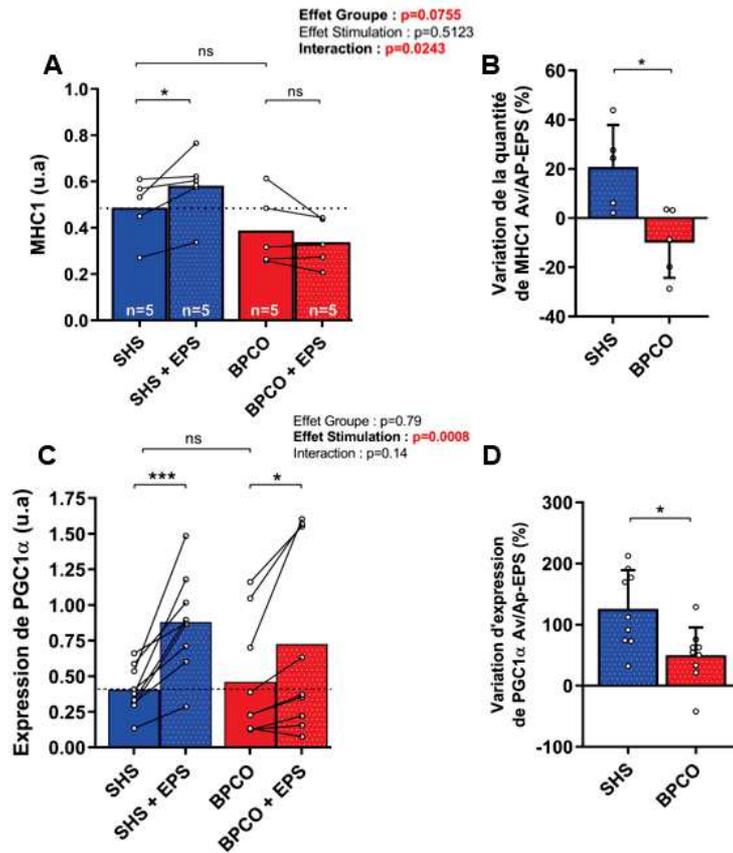


Figure 5 : Effets de l'EPS sur la production de MHC1 et l'expression de PGC1 α dans les myotubes sains et BPCO : (A) Quantification et (B) variations de la quantité de MHC1 dans les myotubes électrostimulés ou non de 9 sujets sains et 9 patients BPCO. (C) Quantification et (D) variation d'expression de PGC1 α dans les mêmes cultures primaires. Les effets d'interaction, de stimulation et de groupe ont été évalués avec une ANOVA deux voies à mesures répétées. (*) indique une différence significative à $p<0,05$ au test de Mann-Whitney.

La surexpression aiguë de la myostatine induite par l'EPS est abolie dans les myotubes de patients BPCO

Nous nous sommes intéressés à la régulation de l'expression de myostatine en réponse à l'EPS. Du fait que les myotubes BPCO non-stimulés ont tendance à surexprimer la myostatine par rapport aux myotubes sains ($p=0,13$; Fig.6A), on constate que l'EPS a des effets opposés sur l'expression de la myostatine (SHS Av/AP-EPS : $0,700\pm0,218$ vs $0,952\pm0,333$ u.a, $p=0,0008$ – BPCO Av/AP-EPS : $0,951\pm0,240$ vs $0,867\pm0,227$ u.a, $p=0,11$; effet d'interaction $p=0,0012$; Fig.6A). L'analyse des variations individuelles permet de souligner le faible effet de l'EPS sur l'expression de myostatine dans les myotubes BPCO comparé aux myotubes sains ($-8,7\pm12,5\%$ vs $+36,8\pm31,8$, $p=0,0008$; Fig.6B). Ces différences pourraient être attribuées au niveau d'expression basale de myostatine plus important dans les myotubes BPCO, induisant une moindre sensibilité des myotubes BPCO à l'EPS.

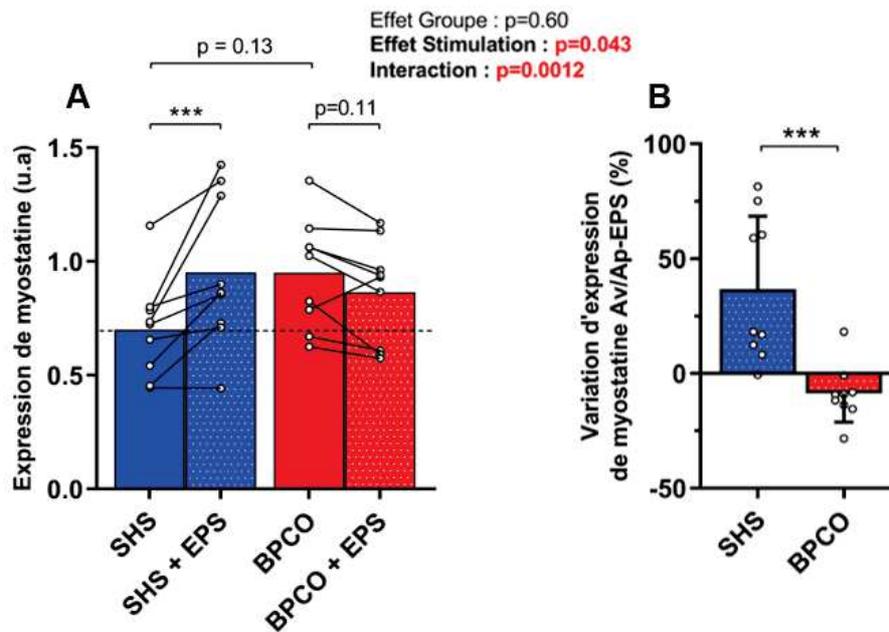


Figure 6 : Effets de l'EPS sur l'expression de myostatine dans les myotubes sains et BPCO : (A) Quantification et (B) variations d'expression de myostatine dans les myotubes électrostimulés ou non de 9 sujets sains et 9 patients BPCO. Les effets d'interaction, de stimulation et de groupe ont été évalués avec une ANOVA deux voies à mesures répétées et (***) indique une différence significative à $p<0,001$ au test de Mann-Whitney.

IV. Discussion :

Les résultats de cette étude montrent pour la première fois que les cultures primaires de myotubes BPCO répondent différemment à un protocole de stimulation électrique *in vitro* comparé aux myotubes issus de sujets sains. Nous avons montré que l'EPS induit un phénomène d'atrophie des myotubes BPCO (Fig.1), qui serait dû à un déséquilibre dans la balance des processus de dégradation et de synthèse protéique induit en réponse à l'EPS (Fig.2 et 3). Parmi les défauts de réponse à l'EPS observés, nous avons montré que les altérations de l'induction de la différenciation (Fig.4) et de l'adaptation à un métabolisme oxydatif (Fig.5) pouvaient participer aux altérations morphologiques touchant les myotubes BPCO. Enfin, nous avons observé dans les myotubes BPCO que la transcription de la myostatine en réponse à l'EPS était atténuée (Fig.6). L'ensemble de ces résultats (rassemblés dans le tableau 2) indiquent un défaut de sensibilité des myotubes BPCO à l'EPS, qui pourrait traduire des défauts d'adaptation à l'effort *in vivo* conduisant aux effets limités du REE chez le patient BPCO.

Tableau 2 : Comparaison des effets induits par l'EPS sur la morphologie cellulaire et la signalisation cellulaire entre les myotubes sains et BPCO

	Sujets sains	Patients BPCO	Effets
Morphologie Cellulaire			
Diamètre	↑	↓**	Interaction
Index de fusion	↑	↓	Interaction
Surface couverte	=	↓*	Interaction
Dégradation Protéique			
MuRF1	↑*	↑	Stimulation / Interaction
Atrogin1	=	=	-
Synthèse Protéique			
pAkt/Akt	↑	↑	Groupe / Stimulation
mTOR	↑***	=	Stimulation / Interaction
Différenciation/Régénération			
MyoD	↑	=	Interaction
MyoG	↓*	↓**	Stimulation
Myostatine	↑***	=	Stimulation / Interaction
Adaptation au métabolisme oxydatif			
MHC1	↑*	=	Groupe / Interaction
PGC1α	↑***	↑*	Stimulation

* : significative ; ↑ : augmentation, ↓ diminution ; = aucune variation

Intérêt du modèle *in vitro* pour reproduire les mécanismes *in vivo*

En combinant la capacité des cultures de cellules musculaires humaines à préserver certains traits phénotypiques relatifs à des pathologies chroniques^{202,348,493} avec la stimulation électrique mimant le stress induit par l'exercice physique, notre étude offre un outil puissant pour révéler des défauts d'adaptation musculaire en réponse à l'exercice chez le patient BPCO. De la même manière, il a récemment été montré que la sensibilité à l'insuline et le stockage du glycogène musculaire sont altérés dans les myotubes de patients obèses et diabétiques, *via* l'absence de surexpression d'IL6 en réponse à la stimulation électrique³⁷⁷. Les auteurs montrent également que, comparés à des myotubes de sujets minces, les myotubes de ces patients présentent des défauts d'adaptation du métabolisme oxydatif associés à une production de MHC1 réduite. Les résultats de cette étude soulignent la capacité de l'EPS *in vitro* à révéler, *via* un stress contrôlé, la présence d'altérations musculaires jusqu'alors indétectable, et confortent ainsi nos observations concernant une réponse différentielle à l'EPS entre les myotubes sains et BPCO.

Atrophie induite par l'EPS dans les myotubes BPCO

Nous avons constaté que les myotubes de patients BPCO présentent une réduction du diamètre en réponse à l'EPS comparé à ceux de sujets sains. Associée au fait que dans ces mêmes myotubes BPCO il existe un déséquilibre de l'homéostasie protéique en faveur de la dégradation protéique, il apparaît que l'EPS a révélé des processus aberrants de régénération musculaire induits par l'exercice.

En effet, l'exercice *in vivo* entraîne une élévation transitoire du stress oxydant, accompagnée d'un déséquilibre entre dégradation et synthèse protéique^{481,482}. Chez les sujets sains, l'impact de ces déséquilibres est atténué par l'entraînement⁴⁸⁰. En revanche, ces adaptations peuvent être altérées chez les patients BPCO^{206,466,467,476,495}, notamment chez certains patients cachectiques qui surexpriment MuRF1 et Atrogin1 après un REE de 10 semaines¹¹⁷. En tenant compte du fait que les myotubes de patients BPCO *in vitro* sont plus sensibles à un stress oxydant²⁰³, il est probable que l'EPS ait entraîné le dépassement des capacités antioxydantes des myotubes de patients, déclenchant un processus d'hypercatabolisme. Il semble envisageable qu'*in vivo*, dans un contexte inflammatoire et pro-oxydant, une partie des effets bénéfiques limités du REE réside dans l'apparition d'une latence dans les processus de régénération musculaire, qui serait médiée par des phases prolongées d'hypercatabolismes post-exercice. Cette hypothèse semble également concorder avec les altérations du métabolisme intermédiaire des acides aminés post-

exercice qui ont été décrites chez les patients BPCO et qui témoignent d'un déséquilibre post-exercice entre dégradation et synthèse protéique⁴⁸³.

L'EPS révèle une altération du recrutement des myoblastes

Outre ces défauts dans la balance anabolisme/catabolisme protéique, nous avons mis en évidence que l'atrophie des myotubes BPCO pouvait également résulter d'un défaut de recrutement des myoblastes. En effet, ce mécanisme de recrutement a été récemment décrit dans des études montrant que l'EPS provoque des microlésions sarcomériques induisant le recrutement de myoblastes durant le processus de régénération^{351,378}. Nos précédents travaux avaient déjà soulevé la présence d'anomalies de la fusion des myoblastes BPCO²⁰², que nous retrouvons également dans la présente étude. Ce défaut est d'ailleurs exacerbé par l'EPS appuyant l'hypothèse qu'un défaut d'accrétion myonucléaire pourrait également participer aux retards de régénération musculaire en réponse au REE.

Une détérioration de l'homéostasie calcique pourrait être un élément important pour expliquer le défaut de recrutement des myoblastes. En effet, plusieurs études ont montré une perte de la sensibilité au calcium dans les muscles squelettique¹⁶⁴ et diaphragmatique⁴⁹⁶ de patients BPCO. Ces anomalies seraient dues à une élévation de la concentration calcique intracellulaire résultant d'un défaut de repompage du calcium par la SERCA. De récentes données non-publiées de notre équipe nous ont indiqué que cette élévation du calcium intracellulaire était également retrouvée dans les myotubes BPCO *in vitro*, suggérant que ces myotubes pourraient également souffrir d'une perte de sensibilité au calcium. Les événements cellulaires intervenant dans la fusion des myoblastes étant majoritairement médiés par le calcium⁴⁹⁷⁻⁵⁰⁰, il semble probable que la fusion soit altérée dans les myotubes de patients, conditionnant également le recrutement de myoblastes en réponse à l'EPS. Il apparaît ainsi que les troubles de l'homéostasie calcique musculaire chez le patient BPCO puissent verrouiller les processus de régénération musculaire et entraîner l'accumulation d'anomalies structurelles des sarcomères^{379,380}. A leur tour, ces anomalies structurelles sont susceptibles d'induire une inefficience de la contraction musculaire, entraîner des déperditions énergétiques et augmenter le travail respiratoire, comme cela a été observé chez des patients BPCO effectuant un exercice sous-maximal^{162,163}.

En revanche, la littérature est encore peu exhaustive concernant l'expression de marqueurs de la différenciation tels que MyoD et MyoG en réponse à l'EPS. Nos résultats indiquent que l'EPS a tendance à promouvoir l'expression de MyoD dans les myotubes

sains, confortant l'idée que la stimulation électrique favorise la différenciation et le recrutement de myoblastes chez les sujets sains comparé aux patients BPCO. Concernant l'expression de MyoG, significativement sous-exprimé suite à l'EPS indépendamment de l'origine des myotubes, ce profil d'expression pourrait être un artéfact lié à l'électrostimulation qui en dépolarisant la membrane des myoblastes induit des variations de calcium pouvant ainsi favoriser la différenciation mais également induire une réponse comparable à une réinnervation. *Eftimie et coll*⁵⁰¹ en 1991, avait décrit des mécanismes similaires en montrant qu'une réduction d'expression de MyoG concordait avec l'expression des récepteurs à l'acétylcholine, traduisant ainsi la phase d'innervation musculaire.

L'ensemble de ces résultats suggèrent que les myoblastes BPCO sont moins sensibles à l'électrostimulation, entraînant un retard de différenciation traduisant une altération des processus de régénération musculaire.

Défaut d'adaptation au métabolisme oxydatif

Il est possible que ce retard de différenciation associé aux processus d'hypercatabolisme des myotubes BPCO électrostimulés conditionne également les mécanismes d'adaptation au métabolisme oxydatif. Comme le montrent nos résultats, malgré l'absence de différence à l'état basal, les myotubes BPCO présentent une moindre surexpression de PGC1 α suite à l'EPS. Une régulation épigénétique de l'expression de ce marqueur pourraient être à l'origine de la réponse émoussée des myotubes BPCO à l'EPS. En effet, une hyperméthylation du promoteur de PGC1 α a été identifiée chez les progénitures de souris ayant été nourri avec un régime riche en graisse⁵⁰². Dans cette étude, les auteurs montrent que la transmission de cette modification épigénétique favorise l'apparition de troubles métaboliques à l'âge adulte et que l'exercice prévient l'apparition de ces troubles en rétablissant le profil de méthylation du promoteur de PGC1 α . Cet effet de l'exercice sur la déméthylation du promoteur de PGC1 α a également été identifié chez l'homme dans des fibres musculaires isolées⁵⁰³. Cependant, cette étude montre également que la déméthylation du promoteur de PGC1 α est dépendante de l'intensité de l'exercice, suggérant que dans nos conditions expérimentales, la réponse émoussée des myotubes BPCO pourrait provenir d'une hyperméthylation stable du promoteur de PGC1 α , ne pouvant être modifiée que par une stimulation de plus forte intensité. Ainsi, les défauts d'adaptation à l'EPS, telle que la production de MHC1, pourraient également résulter de dérégulations épigénétiques spécifiques à la maladie^{326,504,505}.

Effet discordant de l'EPS sur l'expression de myostatine

De manière surprenante, alors que la littérature montre un effet inhibiteur de l'EPS sur l'expression de myostatine^{373,506}, nous avons observé une surexpression de la myostatine dans les myotubes sains suite à la stimulation. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que nos analyses aient été menées immédiatement après la fin du protocole d'EPS, tandis qu'il a été montré que la myostatine est généralement sous-exprimée plus tardivement durant la phase de repos après un REE¹¹⁷. Des analyses consistant à laisser une période de repos post-EPS sont d'ailleurs actuellement en cours dans notre équipe afin de statuer sur ce résultat discordant. A noter qu'il est possible que la myostatine puisse être surexprimée transitoirement en fin de REE (ou d'EPS), afin de faciliter l'infiltration de macrophage sur les sites lésionnels induits par la stimulation comme cela a déjà été identifié dans le tissu adipeux⁵⁰⁷. En revanche, nous n'avons observé aucun effet de la stimulation sur l'expression de myostatine dans les myotubes BPCO, notamment parce que les myotubes BPCO par rapport aux myotubes sains surexpriment de manière basale la myostatine²⁰². Cet élément alimente l'hypothèse que les myotubes BPCO sont réfractaires au stimulus induit par l'EPS.

V. Conclusion :

Nous pouvons conclure que la stimulation électrique *in vitro* nous a permis d'identifier des défauts d'adaptation au métabolisme oxydatif dans les myotubes de patients BPCO soumis à un protocole d'EPS. Ces processus étaient notamment accompagnés d'une atrophie des myotubes en culture, qui pourrait traduire des défauts de régénération musculaires *in vivo*. Dans ce cadre, l'EPS semble être une approche prometteuse qui permettrait d'étudier les mécanismes impliqués dans la limite des bénéfices du REE *in vivo* chez le patient BPCO.

Synthèse Générale

Synthèses et Perspectives

Ce travail de thèse s'inscrit dans la lignée des recherches visant à comprendre l'origine de la dysfonction musculaire chez le patient BPCO, qui représente un enjeu dans la prise en charge des patients. L'objectif principal de ces travaux a été d'étudier l'implication du microenvironnement de la cellule musculaire dans les défauts de différenciation et de régénération qui peuvent conduire à une dysfonction musculaire et à limiter les bénéfices apportés par le REE.

Les quatre premières études abordent tour à tour la régulation par le stress oxydant d'altérations des cellules satellites, le rôle du microenvironnement BPCO les altérations de la différenciation de la cellule satellite, et l'inefficacité du REE à rétablir un microenvironnement propice à la différenciation des cellules satellites. Finalement, la dernière étude montre un défaut d'adaptation des myotubes BPCO à répondre à un stimulus mimant l'exercice physique, constituant ainsi un modèle *in vitro* pour l'étude des bénéfices limités du REE *in vivo*.

L'ensemble de ces études suggèrent une évolution de la composition du microenvironnement au cours de la maladie, avec l'existence d'une potentiel réponse compensatrice. Cette réponse compensatrice semble se manifester par le relargage de facteurs pro-régénératifs dans la circulation entraînant une insensibilité et un épuisement du potentiel myogénique des cellules musculaire.

Il est ainsi probable que préserver le potentiel myogénique des cellules satellites des patients BPCO pourrait rétablir leur fonction musculaire et améliorer durablement les bénéfices induits par le REE.

Etude 1

Synthèse :

La première étude confirme la présence d'un phénotype atrophique des myotubes BPCO *in vitro*. En effet, cette étude montre une hyperactivation de l'autophagie dans les myoblastes et les myotubes de patients BPCO. De manière intéressante, le traitement avec un inhibiteur d'autophagie rétablit le diamètre des myotubes BPCO à un niveau comparable à ceux de sujets sains, appuyant les études *in vivo* qui ont identifié l'autophagie comme impliquée dans le processus d'atrophie musculaire chez le patient BPCO.

Un nombre croissant de preuves place le stress oxydant comme un médiateur de l'autophagie dans les cellules musculaires mais peu de données indiquent son implication dans la BPCO. En exposant des myotubes BPCO à de l'acide ascorbique et en rétablissant un diamètre des myotubes comparable à celui de myotubes sains, cette étude confirme le rôle du stress oxydant dans l'autophagie induite chez les myotubes de patients *in vitro*.

Perspectives :

Cependant, bien que cette première étude ne mette pas en évidence le mécanisme par lequel les ROS régulent l'autophagie, cette étude soulève cependant une question : est-ce que des stimuli exogènes amplifiant les ROS intracellulaires pourrait altérer des processus biologiques tel que l'autophagie et aboutir à un phénotype « BPCO » de la cellule musculaire ? A plus large échelle, est-ce que le sérum de patients BPCO pourrait véhiculer des facteurs susceptibles d'altérer le fonctionnement d'une cellule satellite et déclencher l'apparition d'un phénotype atrophique ? C'est la question à laquelle nous avons voulu répondre à travers les études 2 et 3 (et à plus large titre avec l'étude 4). Cependant, avant d'envisager l'étude des effets du microenvironnement sur les cellules musculaires en culture, il nous a paru pertinent d'établir les conditions de culture assurant la faisabilité et la reproductibilité de nos expérimentations.

Etude 2

Synthèse :

La majorité des études *in vitro* étant menée sur des cellules immortalisées animales, dont la différenciation myogénique est induite avec des milieux supplémentés en sérum également d'origine animal, il a été nécessaire de définir une méthodologie applicable aux cultures de myotubes humains dans un milieu enrichi avec du sérum humain.

En établissant des conditions de culture précises (densité cellulaire à l'ensemencement, passage des cellules, durée de différenciation), nous avons mis en évidence que le sérum humain sain a des effets biologiques sur la différenciation de myoblastes sains différents de ceux engendrés par un sérum animal tel que le SVF. Ces effets sont d'ailleurs indépendants de la variabilité biologique inhérente aux cellules humaines. Mais afin de réduire la variabilité dépendante des séra, nous avons identifié qu'il était possible de regrouper les échantillons sériques de plusieurs sujets, tout en préservant l'effet biologique moyen sur la différenciation myogénique.

Cette implémentation du protocole de culture a ainsi permis de rendre expérimentalement et éthiquement faisable l'étude du microenvironnement BPCO sur la différenciation de myoblastes humains. Nous avons ainsi pu établir la preuve de concept que l'exposition de myotubes sains à du sérum de patients BPCO entraîne un phénomène atrophique et que le sérum de patients BPCO contient des facteurs susceptibles d'altérer la différenciation de myoblastes humains sains.

Perspectives :

Cependant, cette étude n'apporte aucun élément mécanistique par lequel le sérum de patients BPCO altère la différenciation des myotubes sains. L'hypothèse du « *Spill-over* » semble être une théorie adéquate pour expliquer ce processus, d'autant plus si la quantité de facteurs délétères présente dans le sang des patients est amplifiée en fonction de la sévérité de leur maladie. Ainsi, l'exposition à un sérum de patients BPCO de différentes sévérité permettrait non seulement de confirmer l'effet délétère du microenvironnement BPCO sur la différenciation mais également de mettre en évidence une gradation des effets du sérum des patients en fonction de la sévérité de leur maladie.

Etude 3

Synthèse :

La troisième étude de ce travail visait à identifier une potentielle relation entre la sévérité de la maladie et les effets atrophiques du sérum des patients *in vitro*, via l'implication du « *Spill-over* ». Si l'étude 2 suggère que le sérum de patients BPCO est délétère pour les myotubes sains, l'étude 3 indique un effet différentiel du microenvironnement BPCO en fonction de la sévérité de la maladie.

Si de manière similaire à l'étude 2, le sérum des patients les plus légers (GOLD 0-I) a eu tendance à réduire le diamètre des myotubes, le sérum des sujets les plus sévères (GOLD IV) a quant à lui plutôt eu tendance à induire une augmentation du diamètre des myotubes. Un profil similaire a été observé pour l'expression de marqueurs de la différenciation MyoD et MyoG, ainsi que pour l'expression de PGC1 α , où les myotubes exposés à du sérum de patients légers sous-exprimaient ces marqueurs alors que les myotubes exposés à du sérum des patients les plus sévères les surexprimaient. Ceci suggère de manière paradoxale que le sérum provenant de patients sévères serait bénéfique. Or nous avons également observé que ces myotubes surexpriment MuRF1, et qu'indépendamment de la sévérité, le sérum de patients BPCO induit la répression de myostatine, synonyme d'un taux de myostatine circulante plus élevé. Ces éléments confortent l'idée que le sérum de patients sévères véhicule des signaux pro-atrophiques.

La présence de signaux opposés dans les myotubes exposés à du sérum de patients BPCO sévères suggère un phénomène de compensation. D'une part, il est possible que cette réaction d'hypertrophie résulte d'une réponse adaptative des myotubes sains à un microenvironnement stressant, et d'autre part, cette réaction pourrait résulter de la présence de facteurs pro-régénératifs dans le sérum des patients sévères, améliorant ainsi la différenciation des myotubes sains. Cependant, à terme ce processus pourrait rendre insensible les cellules satellites BPCO et épuiser leur potentiel myogénique.

Perspectives :

Le phénomène d'insensibilité est un mécanisme couramment décrit dans l'insulinorésistance⁴⁵⁴, la glucorésistance liée au stress chronique⁴⁵⁵ et la chémorésistance des cellules tumorales⁴⁴⁸. En réponse à un signal d'alerte, l'organisme enclenche un mécanisme de compensation pour répondre au stimulus. Cependant, ce processus est

généralement non-viable à long terme pour l'organisme, entraînant le phénomène d'épuisement.

Dans le cadre de la BPCO, il est possible que le tissu musculaire soit progressivement devenu insensible aux molécules pro-régénératives présentes dans la circulation sanguine. Des expérimentations complémentaires en exposant des myoblastes BPCO à un microenvironnement BPCO permettraient d'illustrer ce mécanisme et confirmerait le caractère délétère du microenvironnement BPCO sur la différenciation des cellules musculaires BPCO. De plus, il semble primordial d'identifier dans le sérum des patients BPCO les facteurs impliqués dans les voies de signalisation aboutissant à ce phénomène d'insensibilité.

Etude 4

Synthèse :

Dans l'étude 4, nous avons également observé une réponse différentielle dans les myotubes sains exposés à du sérum de patients BPCO Ap-REE comparé aux effets induits par le sérum sain Ap-REE. Alors que le sérum de sujets sains Ap-REE a des effets bénéfiques sur le diamètre des myotubes sains, le sérum de patients BPCO Ap-REE entraîne une réduction du diamètre des myotubes exposés. Cet effet du sérum BPCO Ap-REE est dû à la présence de signaux pro-atrophiques qu'il véhicule, entraînant la surexpression de marqueurs cataboliques (MuRF1, Atrogin1, SQSTM/p62, AMBRA1, FoxO1/3). Ces observations appuient les résultats de l'étude 3 sur le rôle pro-atrophique du sérum de patients BPCO.

De plus, le sérum de patients BPCO après REE a également eu tendance à induire l'expression de marqueurs de la différenciation (MyoD et Myf5), ce qui pourrait soutenir l'hypothèse d'un mécanisme de compensation induite par le sérum des patients BPCO Ap-REE par l'activation de voie de la différenciation/régénération des myoblastes sains. Cette compensation pourrait à terme épuiser le potentiel myogénique des myoblastes, comme cela a été proposé par *Kneppers et coll*¹²².

Enfin, outre le rôle délétère du sérum des patients sur la différenciation des myotubes sains, cette étude montre également que le REE ne semble pas en mesure de rétablir la composition du microenvironnement BPCO. La persistance de facteurs pro-atrophiques pourraient être l'élément limitant des effets bénéfiques du REE chez les patients.

Perspectives :

Comme la majorité des processus physiologiques, si les processus de compensation sont protecteurs lorsqu'ils sont activés de manière ponctuelle, ils sont en revanche délétères à long terme. En effet, à l'image de la résistance aux glucocorticoïdes, les tissus chroniquement stimulés par des signaux physiologiques opposés pourraient devenir insensibles et épuiser leur capacité régénérative. *In vitro*, cela pourrait être mis en évidence par un phénotype atrophique des myotubes dérivés de cellules de patients BPCO^{203,508}, un métabolisme altéré^{119,203} et une faible ou une non-réponse des myotubes à des stimulus exogènes.

In vivo, au niveau musculaire, cela se traduirait par l'accumulation d'anomalies structurelles accompagnée d'un remodelage, d'une fibrose aberrante, d'une accumulation de cellules sénescents et finalement de l'inefficacité des approches tel que le REE.

Les perspectives relatives à l'étude 4 sont donc similaires à celles l'étude 3, puisqu'en exposant des myotubes de patients BPCO à du sérum de patients après REE, nous pourrions ainsi révéler une réponse différentielle des myotubes malades par rapport aux myotubes sains, et confirmer l'hypothèse d'une désensibilisation. L'insensibilité des cellules satellites BPCO pourrait correspondre à un état de sénescence précoce, comme proposé par plusieurs équipes^{64,122,123}.

De plus, si de tels éléments sont avérés, cela pourrait avoir des conséquences sur les programmes de réhabilitation, pour lesquels les capacités régénératives musculaires des patients BPCO devraient être préalablement explorés, afin d'envisager des bénéfices durables.

Etude 5

Synthèse :

Le défaut de sensibilité des myoblastes de patients BPCO pourrait également se manifester par un défaut d'adaptation à l'effort en réponse à des approches comme le REE. C'est ce que nous avons mis en évidence dans la dernière étude du travail de thèse, en appliquant une électrostimulation *in vitro* correspondant à un exercice en endurance *in vivo*. Nous avons ainsi constaté que les myotubes de patients BPCO présentaient des défauts d'adaptation à l'EPS.

Alors que les myotubes sains, conformément à la littérature, présentent des bénéfices sur le diamètre des myotubes associés à l'activation de processus de régénération (recrutement et fusion de myoblastes), les myotubes BPCO présentent une aggravation du phénotype atrophique après stimulation. Ces phénomènes atrophiques sont associés à une activation des voies de la dégradation protéique et d'une réponse émoussée de la synthèse protéique, résultant d'un processus d'hypercatabolisme dans les myotubes BPCO électrostimulés. Cette réponse différentielle à l'électrostimulation se répercute également sur la capacité d'adaptation à un métabolisme oxydatif avec une réduction de l'expression de MHC1 et une moindre surexpression de PGC1 α en réponse à la stimulation dans les myotubes BPCO.

Perspectives :

Au fil de ces travaux, l'expression de PGC1 α est apparue essentielle dans la différenciation des myotubes, avec un rôle dans différents processus physiologiques. En effet, ce marqueur semble au carrefour de différentes voies de signalisation importantes dans le cadre de la dysfonction musculaire chez le patient BPCO. Il est à la fois un facteur impliqué dans la réponse au stress oxydant et à l'hypoxie, deux stimuli déterminants dans la genèse d'altérations de la cellule musculaire chez le patient BPCO. Il est également un marqueur de la biogenèse mitochondriale, suggérant un rôle dans la régulation des processus dépendants de l'homéostasie calcique et du métabolisme oxydatif. L'ensemble de ces éléments indique qu'il serait intéressant d'approfondir le rôle de PGC1 α dans les processus de régénération musculaire chez le patient BPCO.

Finalement, une des perspectives les plus importantes de ce travail pourrait être de combiner l'électrostimulation *in vitro* et l'exposition à du sérum de patients BPCO afin de

d'étudier de manière expérimentale le rôle limitant du microenvironnement BPCO sur les effets bénéfiques induits par REE. Ce type d'expérimentation permettrait d'avoir accès à un champ de recherche encore peu exploré relatif à l'étude du sécrétome des myotubes BPCO en réponse à une stimulation électrique. En effet, de nombreuses de preuves montrent que les effets bénéfiques sur la santé passeraient par la sécrétion de myokines en réponse à un exercice^{492,509}. Le manque de plasticité (capacité d'adaptation d'un tissu) des fibres musculaires BPCO pourrait être à l'origine des effets limités du REE et notamment du manque d'effets bénéfiques sur le microenvironnement cellulaire^{386,510}. Identifier des anomalies dans le sécrétome des fibres musculaires BPCO en réponse à un exercice, pourrait constituer une nouvelle piste de recherche intéressante dans l'élaboration de nouvelles stratégies thérapeutiques. Il est possible d'envisager que rétablir un sécrétome musculaire adéquate rétablirait un microenvironnement propice au maintien des bénéfices du REE chez le patient BPCO.

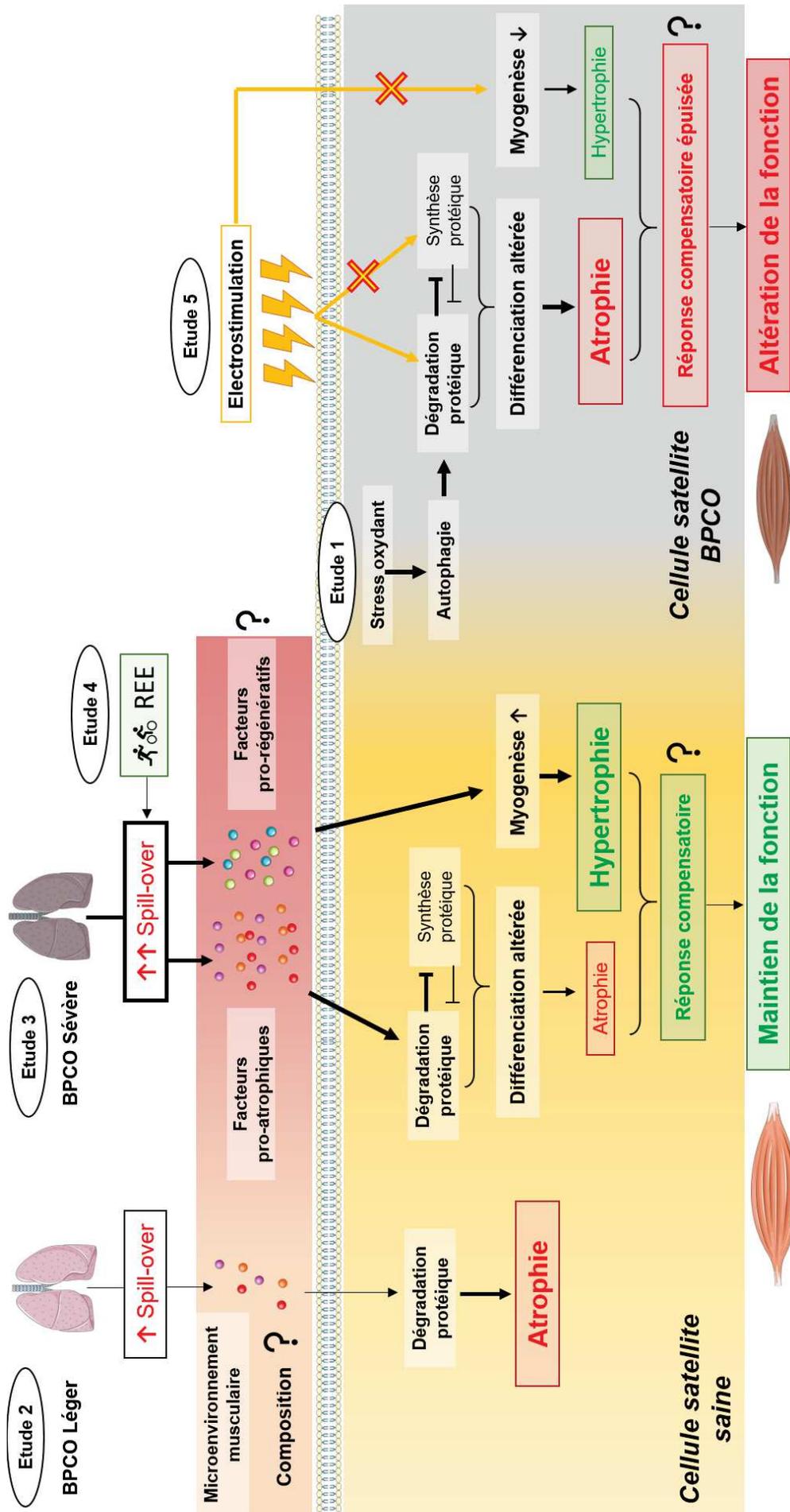
Conclusion

L'ensemble des travaux décrits dans cette thèse suggèrent finalement que la détérioration du microenvironnement par le processus de *spill-over* est un processus évolutif au cours de la maladie et pourrait être un élément moteur de la progression de la dysfonction musculaire à travers le temps et un frein aux effets bénéfiques du REE (voir schéma récapitulatif ci-après).

Si le microenvironnement des patients les plus légers (dont la composition devrait être la moins perturbée) provoque l'atrophie de myotubes sains (étude 2 et 3), on peut supposer qu'un microenvironnement plus délétère (tel que celui de patients sévères) amplifierait ces phénomènes atrophiques. Cependant, nos résultats indiquent plutôt un effet inverse du microenvironnement de patients sévères (étude 3). Ceci pourrait s'expliquer par le fait qu'au cours de l'évolution de la maladie, des mécanismes de compensation de l'organisme se mettent en place afin de préserver la fonction musculaire. Ainsi, l'utilisation du sérum de patients BPCO sévères, véhiculant des molécules pro-régénératives résultant de ces mécanismes de compensation, pourrait alors surpasser les signaux atrophiques et activer les processus de régénération dans des myotubes sains.

Cependant, la persistance du *spill-over* et de la réponse compensatoire qu'il induit, pourrait conduire à l'épuisement progressif des capacités de défense et de régénération des cellules satellites et mener à l'acquisition d'un « phénotype atrophique BPCO ». En effet, il est possible que les phénomènes d'hyper-autophagie observées dans les myotubes BPCO soit le fruit d'un épuisement des défenses anti-oxydantes (étude 1). De manière générale, l'épuisement des capacités régénératives musculaires pourraient également favoriser l'accumulation d'anomalies cellulaires.

Finalement, l'origine des limites du REE à induire des bénéfices pourrait bien provenir du *spill-over*, à la fois en maintenant des signaux pro-atrophiques dans l'environnement de la cellule satellite (étude 4), mais également en épuisant ses capacités d'adaptation, la rendant insensible à une intervention telle que l'électrostimulation (étude 5). Ces éléments appuient les données de la littérature invitant les patients à intégrer des programmes de RR le plus précocement afin de ralentir la progression de la maladie, en profitant des capacités de régénération préservées.



Communications scientifiques

Liste des communications scientifiques :

→ Communications écrites :

- Gouzi et al, (2018) : Oxidative stress regulates autophagy in cultured muscle cells of patients with chronic obstructive pulmonary disease, *Journal of Cellular Physiology*, DOI: 10.1002/jcp.26868
- Catteau et al, (en révision) : Effects of a human microenvironment on the differentiation of human myoblasts, *Plos One*

→ Communications orales :

- Catteau et al, (2019) : *In vitro* electro-stimulation reveals impaired exercise training-induced muscle adaptations of COPD patient myotubes, 3^{ème} Congrès de Physiologie et de Biologie Intégrative, Montpellier, France
- Catteau et al, (2019) : *In vitro* electro-stimulation reveals impaired exercise training-induced muscle adaptations of COPD patient myotubes, 2^{ème} Journée Fédération Hospitalo-Universitaire REGENHAB, Montpellier, France
- Catteau et al, (2019) : *In vitro* electro-stimulation reveals impaired exercise training-induced muscle adaptations of COPD patients myotubes, 15^{ème} Journée de l'Ecole Doctorale SMH, Marseille, France (**Prix de la meilleure communication orale**)

→ Communications affichées :

- Catteau et al, (2019) : An *in vitro* method showing the atrophic effect of the COPD serum on healthy human myotubes, *Poster-Discussion Congrès de l'European Respiratory Society, Madrid, Espagne*
- Catteau et al, (2018) : Post-exercise training serum from COPD patients induces muscle atrophy of healthy human myotubes in vitro, *Poster thématique Congrès de l'European Respiratory Society, Paris, France*

- Catteau et al, (2018) : Post-exercise training serum from COPD patients induces muscle atrophy of healthy human myotubes in vitro, *Poster 14ème Journée de l'Ecole Doctorale SMH, Marseille, France (Prix de la meilleure communication affichée)*

- Pomiès et al, (2016) : The COPD plasmatic microenvironment induces atrophy of healthy human myotubes in vitro, *Poster-Discussion Congrès de l'European Respiratory Society, Milan, Italie*

Apport non-scientifique

Ma thèse en jeu vidéo

En France, une des nombreuses missions des écoles doctorales est d'offrir aux doctorants un accès à des formations afin d'élargir leur culture scientifique et de promouvoir leur interdisciplinarité dans le but de favoriser leur insertion professionnelle. En parallèle de mon activité de recherche, j'ai ainsi pu avoir accès à un large panel de formations me permettant notamment d'approfondir mes connaissances sur le monde de l'entreprise, mais également de développer mes compétences pédagogiques à travers des formations à la prise de parole en public. Bien que chacune des formations que j'ai pu suivre m'ait permis d'apporter une pierre supplémentaire à mon projet professionnel, la participation à « Ma thèse en jeu vidéo » (MTJV) a été une expérience particulière associant mon goût pour la Science, la vulgarisation et le jeu vidéo.

A l'instar de « Ma thèse en 180 secondes » (MT180), MTJV est un évènement scientifique dont le but est de vulgariser la science et la recherche en valorisant le doctorant et son diplôme auprès du grand public. Cependant, à la différence de MT180, MTJV propose de vulgariser la science par l'intermédiaire d'un média différent : le jeu vidéo.

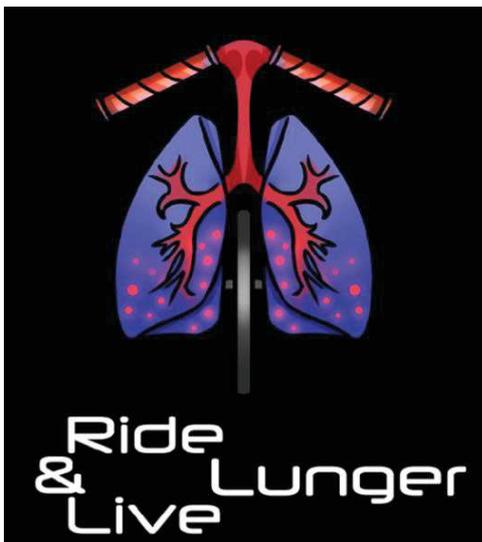
Pour y parvenir, les doctorants de toute discipline participant à MTJV sont mis en relation avec des étudiants en conception d'effets spéciaux, d'animation et de jeux vidéo de l'école ArtFX de Montpellier. Durant 48h, les équipes composées d'un doctorant et de plusieurs étudiants concepteurs vont devoir collaborer pour concevoir un jeu vidéo abordant un aspect de la thèse du doctorant.

Le but final de MTJV est de présenter les jeux vidéo issus de cette collaboration entre deux univers auprès du grand public, majoritairement composé d'enfants et d'adolescents, accompagnés de leurs parents.

Ride & Live Lunger

Pour cette 2^{ème} édition de MTJV, le projet de jeu proposé avait pour but, en plus des éléments relatifs à mon projet de thèse, d'aborder 3 axes de sensibilisation :

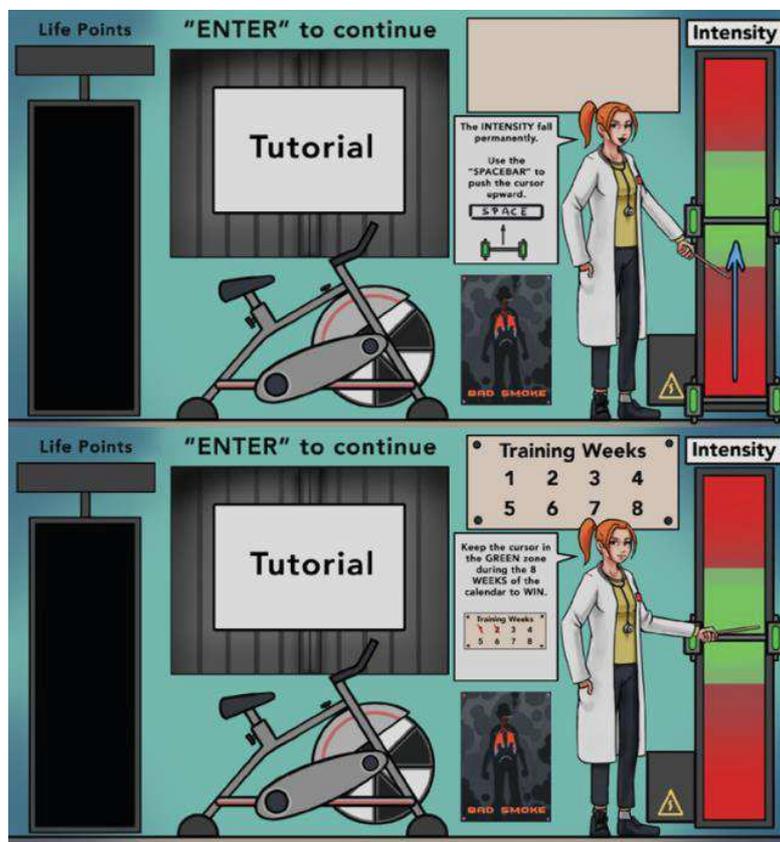
- Axe 1 : Informer sur une maladie commune et pourtant peu connue qu'est la BPCO
- Axe 2 : Sensibiliser sur les risques de la pollution et du tabac
- Axe 3 : Promouvoir l'activité physique comme approche thérapeutique



Afin d'aborder ces différents thèmes, nous avons donc conçu un jeu intitulé « **Ride & Live Lunger** » afin de traduire, par analogie, que l'activité physique permet de vivre plus longtemps. Afin d'accentuer cette analogie, nous avons conçu un logo illustrant un vélo dont le cadre est directement relié à des poumons. Ici, un élément supplémentaire relatif au projet de thèse est symbolisé par les petites billes de couleur rouges, se référant à l'hypothèse du « Spill-Over » comme élément limitant des effets bénéfiques du REE.

Le jeu nous plonge dans une salle qui pourrait s'apparenter à une salle d'épreuve d'effort, dans laquelle nous retrouvons un médecin pour accueillir le joueur et l'accompagner dans le tutoriel du jeu (voir images ci-dessous). Dans cette salle, nous trouvons également un vélo sur lequel se positionnera le patient pour son entraînement.

Le but du jeu est d'entraîner le patient en le faisant pédaler à un rythme adapté. Pour y parvenir, une seule commande : la touche espace. Celle-ci permet à chaque impulsion de faire pédaler le patient. Plus le joueur appuie, plus le patient pédale.



La prise en main a intentionnellement été voulue simple afin de convenir à un panel large de joueurs (qu'ils soient novices ou experts) et laisser la liberté aux joueurs les plus habiles de découvrir les nombreux éléments se rapportant aux 3 axes abordés par le jeu. En revanche, si la prise en main est simple, la jouabilité est quant à elle plus délicate. En effet, nous avons introduit plusieurs niveaux de difficulté afin de retranscrire plusieurs éléments relatifs au REE :

- **La durée du REE** : un calendrier indique le nombre de semaine d'entraînement suivi par le patient traduisant ainsi la progression du joueur dans la partie.
- **L'intensité adaptée des exercices** : l'intensité ciblée par l'exercice est symbolisée sur la droite de l'écran par une zone verte dans la jauge d'intensité (voir image ci-dessous). Cette intensité évolue au cours de la partie et traduit la nécessité de maintenir le patient à un effort adapté.
- **La relation entre bénéfices du REE et « Spill-over »** : sur la gauche de l'écran une représentation de l'organisme du patient au rayon X met en évidence le déplacement de molécules depuis les poumons vers les muscles. Si pédaler à une intensité inadaptée (trop faible ou trop importante) amplifie le déplacement des molécules et fait perdre des points de vie, pédaler à la bonne vitesse permet de préserver les points de vie du patient et de ralentir le « Spill-over » des molécules. Ceci illustre donc les effets limités du REE sur la composition du sang en facteurs inflammatoires.



Enfin, la partie s'arrête dès lors que le joueur a perdu tous ses points vie ou qu'il a réussi à accomplir les 8 semaines de l'entraînement du patient.

Une expérience personnelle

Bien que cette expérience ne permette pas de faire avancer nos connaissances sur la maladie, elle représente malgré tout une progression importante quant à la sensibilisation du grand public sur la maladie.

D'un point de vue personnel, cette expérience constitue un tournant important de ma carrière. Au cours de cette formation, j'ai pu développer des compétences transversales telles que la communication et la gestion de projet / de ressources qui m'ont ouvert au monde de la transition numérique au service de la recherche et de la santé.

Enfin, cela a été pour moi l'occasion de travailler avec des personnes impliquées tant d'un point de vue personnel qu'émotionnel, ce qui rend cette expérience d'autant plus importante et méritait, à mon sens, d'être inscrite dans la globalité de ce travail de thèse.

Annexes

Fiche technique complémentaire 1 : Evaluations cliniques : spirométrie, capacités fonctionnelles musculaires et tolérance à l'effort

I. Spirométrie :

1. Principe :

La spirométrie est un examen indolore permettant d'évaluer les capacités fonctionnelles pulmonaires. Parmi les nombreuses indications, la spirométrie permet d'évaluer des symptômes et de mesurer les effets d'une maladie pulmonaire. Elle permet également de confirmer un diagnostic et de s'assurer de l'état de santé d'un patient avant un programme d'activité physique intense⁵¹¹.

Parmi les nombreux paramètres, la spirométrie permet notamment de définir :

- Le volume expiré maximal en 1 seconde (VEMS) : volume expiré durant la première seconde au cours d'une expiration forcée à partir d'une inspiration complète
- La capacité vitale forcée (CVF) : volume maximal expiré de manière forcée à partir d'une inspiration complète
- Le rapport de Tiffeneau (VEMS/CVF) : rapport entre VEMS et CVF permettant d'évaluer le niveau d'obstruction dans le cadre d'une maladie respiratoire (BPCO ou asthme)

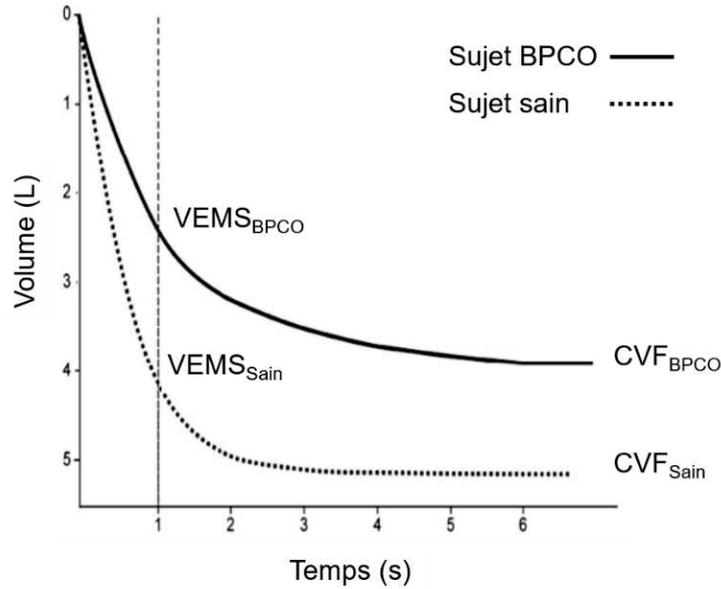
2. Matériels et méthodes :

L'appareil utilisé pour les mesures est un Body Box 5500 (Medisoft, Belgique), respectant les recommandations relatives aux spiromètres (capable d'accumuler des volumes d'air pour une durée $\geq 15s$, pour des volumes $\geq 8L$, avec une précision de mesure de $\pm 3\%$).

Le VEMS et le rapport de Tiffeneau sont tous deux évalués au cours d'une manœuvre de mesure de la CVF. Après s'être assuré qu'aucune fuite ne perturbe les mesures (nez clippé et embout buccal positionné), le patient doit :

- Inspirer rapidement et complètement
- Après une pause $< 1s$ à la fin de l'inspiration complète, expirer jusqu'à ce qu'il n'y ait plus d'air qui puisse être expiré en posture haute

La manœuvre devra être reproduite au moins 3 fois afin de s'assurer de la répétabilité de la mesure, mais ne devra pas excéder 8 manœuvres.



Sujet	VEMS (L)	CVF (L)	VEMS/CVF
Sain	4,15	5,20	80%
BPCO	2,35	3,90	60%

Ainsi, comme exposé dans l'exemple ci-dessus, on distingue que, non seulement la valeur de VEMS et de CVF d'un sujet BPCO sont inférieures à celle d'un sujet sain, mais le rapport de Tiffeneau est inférieur à 80% indiquant une obstruction.

II. Evaluations fonctionnelles musculaires périphériques :

1. Principe :

La force de contraction maximale volontaire (FMV), l'endurance musculaire ou Temps limite (Tlim) du quadriceps et la composition corporelle évaluée par l'IMC et l'IMM sont les principaux paramètres mesurés chez les patients dont les tissus ont été utilisés dans nos expérimentations. Ces éléments permettent d'évaluer la présence d'une dysfonction musculaire^{65,204}.

2. Matériels et méthodes :

Les mesures de FMV et d'endurance musculaire ont été évaluées de la manière décrite dans les précédentes études de l'équipe^{204,244}, avec un banc de force (Banc de Kock, Genin Medical, Les Angles, France). L'appareil est composé d'un harnais relié à un système de roulement à billes et de poulies par une corde non-élastique, le tout associé à un dynamomètre (pour la mesure de force) et à des poids ajustables (pour la mesure d'endurance). La position du patient est contrôlée pendant l'ensemble des exercices.

La FMV du quadriceps est mesurée en position assise sur un banc de force, genou à 90° de flexion. Un capteur analogique dynamométrique recueille la force dégagée lors d'une contraction de quelques secondes et transmet le signal à un système d'acquisition, transformant ainsi le signal analogique en signal numérique visualisé à l'aide d'un ordinateur. Les patients effectuent trois contractions maximales reproductibles (moins de 10% de variabilité) chacune entrecoupée d'une minute de repos. La meilleure valeur est retenue et uniquement pour la jambe dominante).

L'endurance du quadriceps est évaluée en mesurant le temps durant lequel un sujet est capable de maintenir un mouvement à une charge de 30% de la FMV. Ce mouvement est composé d'une alternance d'extension complète du genou à une fréquence de 12 mouvements par minute, imposé par un signal audio. Chaque extension est effectuée de manière rapide et immédiate, suivie par une flexion passive et d'une période de repos. Le test s'arrête lorsque le patient n'est plus capable de respecter la cadence au cours de deux extensions successives (malgré les encouragements verbaux) ou s'il n'est plus capable d'assurer une extension complète.

L'IMM est évalué par bio-impédancemétrie à l'aide des équations de *Janssen et coll*⁵¹². Quant à l'IMC, il correspond au rapport du poids d'un sujet sur le carré de sa taille (exprimée en kg/m²).

III. Test de marche de 6 minutes (TDM6) :

1. Principe :

Le TDM6 est un test qui permet d'évaluer la tolérance à l'effort d'un patient souffrant d'une maladie modérée ou sévère d'origine cardiaque ou respiratoire⁵¹³. Ce test, recommandé dans différentes indications et ne nécessitant pas d'équipement particulier ou d'une qualification spécifique, permet une évaluation de la réponse globale et intégrée des systèmes physiologiques impliqués dans l'exercice (pulmonaire, cardiovasculaire, circulatoire, neuromusculaire et métabolique musculaire), ainsi que la réponse à une intervention médicale.

La majorité des patients n'étant pas en mesure d'accomplir un exercice maximal, le TDM6 permet au patient d'effectuer le test de manière sous-maximale à une intensité auto-imposée, ce qui reflète mieux le niveau d'exercice des activités quotidiennes.

2. Matériels :

Généralement effectué dans un service hospitalier, le test nécessite d'avoir à disposition :

- Un chronomètre
- Un compte-tour
- Deux plots signalant les virages
- Une chaise facilement transportable le long de la zone de marche
- Une feuille de note
- Une source d'oxygène
- Un tensiomètre
- Un téléphone
- Un défibrillateur

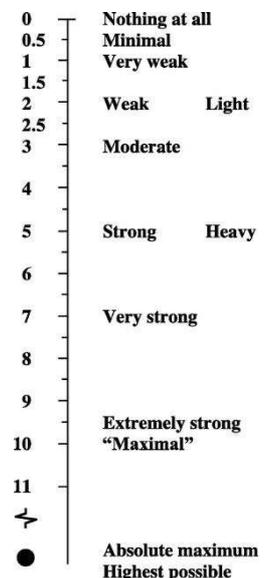
Le TDM6 s'effectue sans échauffement préalable, dans un couloir d'au moins 30m de longueur, disposant idéalement de marqueurs de distance tous les 3m et d'une ligne de départ signalant les tours de 60m.

3. Méthodologie :

La méthode employée est celle décrite dans les recommandations de l'ATS⁵¹³.

- Evaluer le niveau de dyspnée basale du patient (avec l'échelle de Borg ci-contre)
- Donner les instructions suivantes : « *L'objet de ce test est de marcher le plus loin possible en 6 minutes. Vous allez marcher d'en un sens et puis dans un autre, le long de ce couloir. 6 minutes est une durée de marche assez longue, vous risquez donc d'être essoufflé mais vous avez le droit de ralentir, de vous arrêter et de récupérer si nécessaire.*

Vous pouvez vous appuyer contre le mur, mais dès que vous êtes prêt, reprenez la marche. Au virage vous devez contourner le cône et revenir. Pour cela pivoter brièvement et sans hésitation. Je vais maintenant vous montrer, regardez bien où je fais demi-tour sans hésitation. » Après avoir montré un tour, reprenez : « *Êtes-vous prêt pour y aller ? J'utilise ce compteur pour mesurer le nombre de tour que vous complétez. Je cliquerais à chaque fois que vous passerez la ligne de départ. Rappelez-vous l'objectif est d'aller le plus loin possible en 6 minutes,*



mais ne courez pas ou ne faites pas un jogging. Démarrez de suite ou dès que vous êtes prêt ».

- Durant le test, rester à proximité de la ligne de départ et ne pas encourager le patient. Indiquer lui seulement le temps restant
- Tout au long du test, le patient pourra s'arrêter, cependant il ne faut pas arrêter le chronomètre
- Si le patient s'arrête en cours de test et qu'il refuse de reprendre ou que vous estimez qu'il ne doit pas continuer, notez la distance parcourue et indiquer la raison de l'interruption

Après le test :

- Evaluer le niveau de dyspnée et de fatigue avec l'échelle de Borg, et demander au patient la raison pour laquelle il n'a pas réussi à aller plus loin
- Mesurer la distance parcourue (nombre de tour + distance additionnelle arrondie au mètre)
- Félicitez le patient pour son effort et inviter le à s'hydrater

Fiche technique complémentaire 2 : Réentraînement à l'effort

I. Principe :

Le REE est une composante primordiale de la RR. Il consiste en un programme d'exercice physique individualisé à chaque patient afin de rétablir une tolérance à l'effort.

II. Méthodologie :

En accord avec les recommandations internationales²³⁴, le REE suivi par les sujets sains et patients a été décrit dans une précédente étude de notre groupe²⁴⁴. Il consiste en 24 sessions d'entraînement en endurance à une intensité correspondant au premier seuil ventilatoire (pour les sujets sains) ou à l'intensité pour laquelle des symptômes de dyspnée apparaissent (pour les patients).

Cette intensité est considérée comme modérée et déterminée individuellement pour chaque sujet au préalable au cours d'une épreuve d'effort. Tout au long du REE, les exercices sont calibrés de manière à atteindre cette intensité monitorée à travers la fréquence cardiaque correspondante à ce seuil ventilatoire ou l'apparition des symptômes limitants. A noter qu'afin de maintenir une progression continue, la charge de travail augmente progressivement au fur et à mesure des séances.

Chaque séance dure environ 1h30 avec :

- 45 min d'entraînement en endurance (variable selon la sévérité du patient) comprenant un temps d'échauffement et de récupération. Les exercices sont effectués sur cycloergomètre et peuvent être complétés par de la marche à une intensité similaire
- 30 min d'entraînement en résistance réalisés sur des jours non-consécutifs. Ces entraînements se composent d'exercices de 10 à 15 répétitions mobilisant 8 à 10 groupes musculaires majeurs. De manière similaire, l'intensité des exercices est évaluée à l'aide d'une échelle d'intensité perçue, avec pour cible de travailler à une intensité de 5 à 6 sur 10

L'ensemble du programme s'inscrit dans le cadre d'un programme de RR d'environ 6 semaines au cours desquelles les patients suivent des séances d'éducation thérapeutique, reçoivent des conseils nutritionnels et sont accompagnés dans la cessation du tabagisme afin de promouvoir un changement de comportement favorisant l'adhérence au programme et le maintien des bénéfices dans le temps.

Type de programme	But	Modalités
Endurance	Améliorer les capacités aérobiques	Vélo et marche
Fractionné	Améliorer la tolérance des patients dans l'incapacité d'assurer des entraînements en endurance réguliers	Exercices à haute intensité espacés d'exercices à faible intensité ou de repos
Résistance/Force	Améliorer la fonction de groupes musculaires spécifiques ciblés	Exercices composés de répétitions de levées de charges lourdes
Entraînement des muscles supérieurs	Améliorer la tolérance des tâches du quotidien (habillement, toilette...)	Entraînement mixte composé d'exercices en endurance et en résistance
Entraînement des muscles inspiratoires	Améliorer la dyspnée et la tolérance à l'effort	Entraînement présentant une charge $\geq 30\%$ de pression inspiratoire maximale

Bibliographie

1. Quaderi, S. A. & Hurst, J. R. The unmet global burden of COPD. *Glob. Health Epidemiol. Genomics* **3**, (2018).
2. Gold Reports for Personal Use. *Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease - GOLD* <https://goldcopd.org/gold-reports/> (2019).
3. Fuhrman, C. & Delmas, M.-C. Épidémiologie descriptive de la bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO) en France. *Rev. Mal. Respir.* **27**, 160–168 (2010).
4. Fletcher, C. Standardised questionnaire on respiratory symptoms: a statement prepared and approved by the MRC Committee on the Aetiology of Chronic Bronchitis. *BMJ* **2**, 241–243 (1960).
5. Jones, P. W. *et al.* Development and first validation of the COPD Assessment Test. *Eur. Respir. J.* **34**, 648–654 (2009).
6. Hurst, J. R. *et al.* Susceptibility to Exacerbation in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *N. Engl. J. Med.* **363**, 1128–1138 (2010).
7. Celli, B. R., Casanova, C. & Plata, V. P. The Body-Mass Index, Airflow Obstruction, Dyspnea, and Exercise Capacity Index in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *N. Engl. J. Med.* **8** (2004).
8. Fletcher, C. & Peto, R. The natural history of chronic airflow obstruction. *BMJ* **1**, 1645–1648 (1977).
9. Hogg, J. C., Buzatu, L. & Coxson, H. O. The Nature of Small-Airway Obstruction in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *N. Engl. J. Med.* **9** (2004).
10. Kohansal, R. *et al.* The natural history of chronic airflow obstruction revisited: an analysis of the Framingham offspring cohort. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **180**, 3–10 (2009).
11. Nasr, S. Z. & Sweet, S. C. Electronic Cigarette Use in Middle and High School Students Triples from 2013 to 2014. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **192**, 276–278 (2015).
12. Marchetti, N. *et al.* Association between Occupational Exposure and Lung Function, Respiratory Symptoms, and High-Resolution Computed Tomography Imaging in COPD Gene. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **190**, 756–762 (2014).
13. Ezzati, M. Indoor air pollution and health in developing countries. *The Lancet* **366**, 104–106 (2005).
14. Svanes, Ø. *et al.* Cleaning at Home and at Work in Relation to Lung Function Decline and Airway Obstruction. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **197**, 1157–1163 (2018).
15. Eisner, M. D. *et al.* An Official American Thoracic Society Public Policy Statement: Novel Risk Factors and the Global Burden of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **182**, 693–718 (2010).
16. Lamprecht, B. *et al.* COPD in Never Smokers. *Chest* **139**, 752–763 (2011).
17. Olloquequi, J. *et al.* Comparative analysis of COPD associated with tobacco smoking, biomass smoke exposure or both. *Respir. Res.* **19**, 13 (2018).
18. Mercado, N., Ito, K. & Barnes, P. J. Accelerated ageing of the lung in COPD: new concepts. *Thorax* **70**, 482–489 (2015).
19. Landis, S. *et al.* Continuing to Confront COPD International Patient Survey: methods, COPD prevalence, and disease burden in 2012–2013. *Int. J. Chron. Obstruct. Pulmon. Dis.* **597** (2014) doi:10.2147/COPD.S61854.
20. Hardin, M. *et al.* Sex-specific features of emphysema among current and former smokers with COPD. *Eur. Respir. J.* **47**, 104–112 (2016).
21. Martinez, F. J. *et al.* Sex Differences in Severe Pulmonary Emphysema. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **176**, 243–252 (2007).
22. Stoller, J. K. & Aboussouan, L. S. α 1-antitrypsin deficiency. *The Lancet* **365**, 2225–2236 (2005).
23. Hunninghake, G. M. *et al.* MMP12, lung function, and COPD in high-risk populations. *N. Engl. J. Med.* **361**, 2599–2608 (2009).

24. Ding, Z. *et al.* Association between glutathione S-transferase gene M1 and T1 polymorphisms and chronic obstructive pulmonary disease risk: A meta-analysis. *Clin. Genet.* **95**, 53–62 (2019).
25. Repapi, E. *et al.* Genome-wide association study identifies five loci associated with lung function. *Nat. Genet.* **42**, 36–44 (2010).
26. Sakornsakolpat, P. *et al.* Genetic landscape of chronic obstructive pulmonary disease identifies heterogeneous cell-type and phenotype associations. *Nat. Genet.* **51**, 494 (2019).
27. Agusti, A. & Faner, R. Lung function trajectories in health and disease. *Lancet Respir. Med.* **7**, 358–364 (2019).
28. Martinez, F. D. Early-Life Origins of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *N. Engl. J. Med.* **375**, 871–878 (2016).
29. Stocks, J. & Sonnappa, S. Early life influences on the development of chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax* **7**, 161–173 (2013).
30. Lange, P. *et al.* Lung-Function Trajectories Leading to Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *N. Engl. J. Med.* **373**, 111–122 (2015).
31. Silva, G. E., Sherrill, D. L., Guerra, S. & Barbee, R. A. Asthma as a Risk Factor for COPD in a Longitudinal Study. *CHEST* **126**, 59–65 (2004).
32. Guerra, S. *et al.* Chronic bronchitis before age 50 years predicts incident airflow limitation and mortality risk. *Thorax* **64**, 894–900 (2009).
33. de Marco, R. *et al.* Risk Factors for Chronic Obstructive Pulmonary Disease in a European Cohort of Young Adults. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **183**, 891–897 (2011).
34. Beran, D., Zar, H. J., Perrin, C., Menezes, A. M. & Burney, P. Burden of asthma and chronic obstructive pulmonary disease and access to essential medicines in low-income and middle-income countries. *Lancet Respir. Med.* **3**, 159–170 (2015).
35. Lee, Y. S. *et al.* The association between living below the relative poverty line and the prevalence of chronic obstructive pulmonary disease. *J. Thorac. Dis.* **11**, 427–437 (2019).
36. Townend, J. *et al.* The association between chronic airflow obstruction and poverty in 12 sites of the multinational BOLD study. *Eur. Respir. J.* **49**, 1601880 (2017).
37. Barrett, C. B., Carter, M. R. & Chavas, J.-P. The Economics of Poverty Traps. (2018).
38. Quach, A. *et al.* Prevalence and underdiagnosis of airway obstruction among middle-aged adults in northern France: The ELISABET study 2011–2013. *Respir. Med.* **109**, 1553–1561 (2015).
39. Lamprecht, B. *et al.* COPD in never smokers: results from the population-based burden of obstructive lung disease study. *Chest* **139**, 752–763 (2011).
40. Menezes, A. M. B. *et al.* Chronic obstructive pulmonary disease in five Latin American cities (the PLATINO study): a prevalence study. *Lancet Lond. Engl.* **366**, 1875–1881 (2005).
41. Schirnhofner, L. *et al.* COPD prevalence in Salzburg, Austria: results from the Burden of Obstructive Lung Disease (BOLD) Study. *Chest* **131**, 29–36 (2007).
42. Adeloye, D. *et al.* Global and regional estimates of COPD prevalence: Systematic review and meta-analysis. *J. Glob. Health* **5**, (2015).
43. Buist, A. S. *et al.* International variation in the prevalence of COPD (The BOLD Study): a population-based prevalence study. *The Lancet* **370**, 741–750 (2007).
44. Halbert, R. J. *et al.* Global burden of COPD: systematic review and meta-analysis. *Eur. Respir. J.* **28**, 523–532 (2006).
45. Mathers, C. D. & Loncar, D. Projections of Global Mortality and Burden of Disease from 2002 to 2030. *PLOS Med.* **3**, e442 (2006).
46. WHO | Projections of mortality and causes of death, 2016 to 2060. WHO http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/projections/en/ (2018).

47. The Economic Burden of Lung Disease - ERS. <https://www.erswhitebook.org/chapters/the-economic-burden-of-lung-disease/> (2019).
48. Guarascio, A. J., Ray, S. M., Finch, C. K. & Self, T. H. The clinical and economic burden of chronic obstructive pulmonary disease in the USA. *Clin. Outcomes Res. CEOR* **5**, 235–245 (2013).
49. Sin, D. D., Stafinski, T., Ng, Y. C., Bell, N. R. & Jacobs, P. The impact of chronic obstructive pulmonary disease on work loss in the United States. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **165**, 704–707 (2002).
50. Kyu, H. H. *et al.* Global, regional, and national disability-adjusted life-years (DALYs) for 359 diseases and injuries and healthy life expectancy (HALE) for 195 countries and territories, 1990–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *The Lancet* **392**, 1859–1922 (2018).
51. Brusselle, G. G., Joos, G. F. & Bracke, K. R. New insights into the immunology of chronic obstructive pulmonary disease. *The Lancet* **378**, 1015–1026 (2011).
52. Willemse, B. W. M. Effect of 1-year smoking cessation on airway inflammation in COPD and asymptomatic smokers. *Eur. Respir. J.* **26**, 835–845 (2005).
53. McDonough, J. E. *et al.* Small-Airway Obstruction and Emphysema in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *N. Engl. J. Med.* **365**, 1567–1575 (2011).
54. Cosio, M. *et al.* The Relations between Structural Changes in Small Airways and Pulmonary-Function Tests. *N. Engl. J. Med.* **298**, 1277–1281 (1978).
55. Wright, J. L. *et al.* Airway Remodeling in the Smoke Exposed Guinea Pig Model. *Inhal. Toxicol.* **19**, 915–923 (2007).
56. Netgen. Emphysème pulmonaire: mécanismes et nouvelles perspectives thérapeutiques. *Revue Médicale Suisse* <https://www.revmed.ch/RMS/2005/RMS-41/30761> (2005).
57. Taraseviciene-Stewart, L. & Voelkel, N. F. Molecular pathogenesis of emphysema. *J. Clin. Invest.* **118**, 394–402 (2008).
58. Barnes, P. J. & Celli, B. R. Systemic manifestations and comorbidities of COPD. *Eur. Respir. J.* **33**, 1165–1185 (2009).
59. Divo, M. *et al.* Comorbidities and Risk of Mortality in Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **186**, 155–161 (2012).
60. Negewo, N. A., Gibson, P. G. & McDonald, V. M. COPD and its comorbidities: Impact, measurement and mechanisms. *Respirology* **20**, 1160–1171 (2015).
61. Sin, D. D., Anthonisen, N. R., Soriano, J. B. & Agustí, A. G. Mortality in COPD: role of comorbidities. *Eur. Respir. J.* **28**, 1245–1257 (2006).
62. Sundh, J. *et al.* Comorbidity and health-related quality of life in patients with severe chronic obstructive pulmonary disease attending Swedish secondary care units. *Int. J. Chron. Obstruct. Pulmon. Dis.* **173** (2015) doi:10.2147/COPD.S74645.
63. Vanfleteren, L. E. G. W. *et al.* Clusters of Comorbidities Based on Validated Objective Measurements and Systemic Inflammation in Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **187**, 728–735 (2013).
64. Triest, F. J. J. *et al.* Disease-Specific Comorbidity Clusters in COPD and Accelerated Aging. *J. Clin. Med.* **8**, 511 (2019).
65. Maltais, F. *et al.* An Official American Thoracic Society/European Respiratory Society Statement: Update on Limb Muscle Dysfunction in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **189**, e15–e62 (2014).
66. Seymour, J. M. *et al.* The prevalence of quadriceps weakness in COPD and the relationship with disease severity. *Eur. Respir. J.* **36**, 81–88 (2010).

67. Decramer, M., Gosselink, R., Troosters, T., Verschueren, M. & Evers, G. Muscle weakness is related to utilization of health care resources in COPD patients. *Eur. Respir. J.* **10**, 417–423 (1997).
68. Mostert, R., Goris, A., Weling-Scheepers, C., Wouters, E. F. M. & Schols, A. M. W. J. Tissue depletion and health related quality of life in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Respir. Med.* **94**, 859–867 (2000).
69. Coronell, C. *et al.* Relevance of assessing quadriceps endurance in patients with COPD. *Eur. Respir. J.* **24**, 129–136 (2004).
70. Kharbanda, S., Ramakrishna, A. & Krishnan, S. Prevalence of quadriceps muscle weakness in patients with COPD and its association with disease severity. *Int. J. Chron. Obstruct. Pulmon. Dis.* **10**, 1727–1735 (2015).
71. Bernard, S. *et al.* Peripheral Muscle Weakness in Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease. **158**, 6 (1998).
72. Marquis, K. *et al.* Midthigh Muscle Cross-Sectional Area Is a Better Predictor of Mortality than Body Mass Index in Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **166**, 809–813 (2002).
73. Schols, A. M. W. J., Broekhuizen, R., Weling-Scheepers, C. A. & Wouters, E. F. Body composition and mortality in chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Clin. Nutr.* **82**, 53–59 (2005).
74. Swallow, E. B. *et al.* Quadriceps strength predicts mortality in patients with moderate to severe chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax* **62**, 115–120 (2007).
75. Fermoselle, C. *et al.* Does oxidative stress modulate limb muscle atrophy in severe COPD patients? *Eur. Respir. J.* **40**, 851–862 (2012).
76. Vestbo, J. *et al.* Body mass, fat-free body mass, and prognosis in patients with chronic obstructive pulmonary disease from a random population sample: findings from the Copenhagen City Heart Study. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **173**, 79–83 (2006).
77. Sanford, L., Larry, K., John, L. & Boris, T. Cellular Adaptations in the Diaphragm in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *N. Engl. J. Med.* **8** (1997).
78. Miranda, E. F., Malaguti, C., Marchetti, P. H. & Corso, S. D. Upper and Lower Limb Muscles in Patients With COPD: Similarities in Muscle Efficiency But Differences in Fatigue Resistance. *Respir. Care* **59**, 62–69 (2014).
79. Maltais, F., Leblanc, P., Jobin, J. & Casaburi, R. Dysfonction musculaire périphérique dans la bronchopneumopathie chronique obstructive. **10** (2002).
80. Hopkinson, N. S. *et al.* A prospective study of decline in fat free mass and skeletal muscle strength in chronic obstructive pulmonary disease. *Respir. Res.* **8**, 25 (2007).
81. Engelen, M. P., Schols, A. M., Does, J. D. & Wouters, E. F. Skeletal muscle weakness is associated with wasting of extremity fat-free mass but not with airflow obstruction in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Clin. Nutr.* **71**, 733–738 (2000).
82. Engelen, M. P., Schols, A. M., Baken, W. C., Wesseling, G. J. & Wouters, E. F. Nutritional depletion in relation to respiratory and peripheral skeletal muscle function in out-patients with COPD. *Eur. Respir. J.* **7**, 1793–1797 (1994).
83. Reed, R. L., Pearlmutter, L., Yochum, K., Meredith, K. E. & Mooradian, A. D. The relationship between muscle mass and muscle strength in the elderly. *J. Am. Geriatr. Soc.* **39**, 555–561 (1991).
84. Berg, H. E., Larsson, L. & Tesch, P. A. Lower limb skeletal muscle function after 6 wk of bed rest. *J. Appl. Physiol.* **82**, 182–188 (1997).
85. Malaguti, C. *et al.* Scaling skeletal muscle function to mass in patients with moderate-to-severe COPD. *Eur. J. Appl. Physiol.* **98**, 482–488 (2006).

86. Allaire, J. *et al.* Peripheral muscle endurance and the oxidative profile of the quadriceps in patients with COPD. *Thorax* **59**, 673–678 (2004).
87. Janaudis-Ferreira, T., Wadell, K., Sundelin, G. & Lindström, B. Thigh muscle strength and endurance in patients with COPD compared with healthy controls. *Respir. Med.* **100**, 1451–1457 (2006).
88. Gosker, H. R. *et al.* Muscle fiber type IIX atrophy is involved in the loss of fat-free mass in chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Clin. Nutr.* **76**, 113–119 (2002).
89. Glass, D. J. Skeletal muscle hypertrophy and atrophy signaling pathways. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **37**, 1974–1984 (2005).
90. Manning, B. D. & Cantley, L. C. AKT/PKB Signaling: Navigating Downstream. *Cell* **129**, 1261–1274 (2007).
91. Egerman, M. A. & Glass, D. J. Signaling pathways controlling skeletal muscle mass. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **49**, 59–68 (2014).
92. Schiaffino, S. & Mammucari, C. Regulation of skeletal muscle growth by the IGF1-Akt/PKB pathway: insights from genetic models. *Skelet. Muscle* **1**, 4 (2011).
93. Huang, J. & Forsberg, N. E. Role of calpain in skeletal-muscle protein degradation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95**, 12100–12105 (1998).
94. Mizushima, N., Yoshimori, T. & Levine, B. Methods in Mammalian Autophagy Research. *Cell* **140**, 313–326 (2010).
95. Bodine, S. C. *et al.* Identification of Ubiquitin Ligases Required for Skeletal Muscle Atrophy. *Science* **294**, 1704–1708 (2001).
96. Lecker, S. H., Goldberg, A. L. & Mitch, W. E. Protein Degradation by the Ubiquitin–Proteasome Pathway in Normal and Disease States. *J. Am. Soc. Nephrol.* **17**, 1807–1819 (2006).
97. Bonaldo, P. & Sandri, M. Cellular and molecular mechanisms of muscle atrophy. *Dis. Model. Mech.* **6**, 25–39 (2013).
98. Miyamoto, Y., Hanna, D. L., Zhang, W., Baba, H. & Lenz, H.-J. Molecular Pathways: Cachexia Signaling—A Targeted Approach to Cancer Treatment. *Clin. Cancer Res.* **22**, 3999–4004 (2016).
99. Hurley, J. H. & Young, L. N. Mechanisms of Autophagy Initiation. *Annu. Rev. Biochem.* **86**, 225–244 (2017).
100. Dumont, N. A., Bentzinger, C. F., Sincennes, M.-C. & Rudnicki, M. A. Satellite Cells and Skeletal Muscle Regeneration. *Compr. Physiol.* **5**, 1027–1059 (2015).
101. Pallafacchina, G., Blaauw, B. & Schiaffino, S. Role of satellite cells in muscle growth and maintenance of muscle mass. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* **23**, S12–S18 (2013).
102. Renault, V. *et al.* Skeletal muscle regeneration and the mitotic clock. *Exp. Gerontol.* **35**, 711–719 (2000).
103. Roth, S. M. *et al.* Skeletal muscle satellite cell populations in healthy young and older men and women. *Anat. Rec.* **260**, 351–358 (2000).
104. Chakkalakal, J. V., Jones, K. M., Basson, M. A. & Brack, A. S. The aged niche disrupts muscle stem cell quiescence. *Nature* **490**, 355–360 (2012).
105. Sousa-Victor, P. *et al.* Geriatric muscle stem cells switch reversible quiescence into senescence. *Nature* **506**, 316–321 (2014).
106. Sousa-Victor, P. & Muñoz-Cánoves, P. Regenerative decline of stem cells in sarcopenia. *Mol. Aspects Med.* **50**, 109–117 (2016).
107. Brack, A. S. *et al.* Increased Wnt Signaling During Aging Alters Muscle Stem Cell Fate and Increases Fibrosis. *Science* **317**, 807–810 (2007).
108. Fry, C. S. *et al.* Inducible depletion of satellite cells in adult, sedentary mice impairs muscle regenerative capacity without affecting sarcopenia. *Nat. Med.* **21**, 76–80 (2015).

109. Barreiro, E. & Jaitovich, A. Muscle atrophy in chronic obstructive pulmonary disease: molecular basis and potential therapeutic targets. *J. Thorac. Dis.* **10**, S1415–S1424 (2018).
110. Gea, J., Pascual, S., Casadevall, C., Orozco-Levi, M. & Barreiro, E. Muscle dysfunction in chronic obstructive pulmonary disease: update on causes and biological findings. *J. Thorac. Dis.* **7**, E418–E438–E438 (2015).
111. Langen, R. C. J., Gosker, H. R., Remels, A. H. V. & Schols, A. M. W. J. Triggers and mechanisms of skeletal muscle wasting in chronic obstructive pulmonary disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **45**, 2245–2256 (2013).
112. Sanders, K. J. C., Kneppers, A. E. M., Bool, C. van de, Langen, R. C. J. & Schols, A. M. W. J. Cachexia in chronic obstructive pulmonary disease: new insights and therapeutic perspective. *J. Cachexia Sarcopenia Muscle* **7**, 5–22 (2016).
113. Crul, T. *et al.* Gene Expression Profiling in Vastus Lateralis Muscle During an Acute Exacerbation of COPD. *Cell. Physiol. Biochem.* **25**, 491–500 (2010).
114. Doucet, M. *et al.* Muscle Atrophy and Hypertrophy Signaling in Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **176**, 261–269 (2007).
115. Lemire, B. B. *et al.* MAPK signaling in the quadriceps of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *J. Appl. Physiol.* **113**, 159–166 (2012).
116. Plant, P. J. *et al.* Cellular Markers of Muscle Atrophy in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **42**, 461–471 (2010).
117. Vogiatzis, I. *et al.* Effect of pulmonary rehabilitation on muscle remodelling in cachectic patients with COPD. *Eur. Respir. J.* **36**, 301–310 (2010).
118. Guo, Y. *et al.* Autophagy in locomotor muscles of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **188**, 1313–1320 (2013).
119. Gouzi, F. *et al.* Oxidative stress regulates autophagy in cultured muscle cells of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *J. Cell. Physiol.* **233**, 9629–9639 (2018).
120. Doucet, M. *et al.* Atrophy and hypertrophy signalling of the quadriceps and diaphragm in COPD. *Thorax* **65**, 963–970 (2010).
121. Lewis, A. *et al.* Downregulation of the serum response factor/miR-1 axis in the quadriceps of patients with COPD. *Thorax* **67**, 26–34 (2012).
122. Kneppers, A. E. M. *et al.* Increased Myogenic and Protein Turnover Signaling in Skeletal Muscle of Chronic Obstructive Pulmonary Disease Patients With Sarcopenia. *J. Am. Med. Dir. Assoc.* **18**, 637.e1–637.e11 (2017).
123. Thériault, M.-E., Paré, M.-È., Maltais, F. & Debigaré, R. Satellite Cells Senescence in Limb Muscle of Severe Patients with COPD. *PLoS ONE* **7**, e39124 (2012).
124. Thériault, M.-E., Paré, M.-È., Lemire, B. B., Maltais, F. & Debigaré, R. Regenerative defect in vastus lateralis muscle of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Respir. Res.* **15**, 35 (2014).
125. Lakhdar, R. *et al.* Role of accelerated aging in limb muscle wasting of patients with COPD. *Int. J. Chron. Obstruct. Pulmon. Dis.* **Volume 13**, 1987–1998 (2018).
126. Allen, D. L. *et al.* Apoptosis: a mechanism contributing to remodeling of skeletal muscle in response to hindlimb unweighting. *Am. J. Physiol.-Cell Physiol.* **273**, C579–C587 (1997).
127. Agustí, A. G. N. *et al.* Skeletal Muscle Apoptosis and Weight Loss in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **166**, 485–489 (2002).
128. Barreiro, E. *et al.* Inflammatory cells and apoptosis in respiratory and limb muscles of patients with COPD. *J. Appl. Physiol.* **111**, 808–817 (2011).
129. Vogiatzis, I. *et al.* Effects of rehabilitative exercise on peripheral muscle TNF α , IL-6, IGF-I and MyoD expression in patients with COPD. *Thorax* **62**, 950–956 (2007).
130. Kollias, H. D. & McDermott, J. C. Transforming growth factor- β and myostatin signaling in skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.* **104**, 579–587 (2008).

131. Hayot, M. *et al.* Myostatin up-regulation is associated with the skeletal muscle response to hypoxic stimuli. *Mol. Cell. Endocrinol.* **332**, 38–47 (2011).
132. Man, W. D.-C. *et al.* Quadriceps myostatin expression in COPD. *Eur. Respir. J.* **36**, 686–688 (2010).
133. Jaitovich, A. & Barreiro, E. Skeletal Muscle Dysfunction in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. What We Know and Can Do for Our Patients. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **198**, 175–186 (2018).
134. Pitta, F. *et al.* Characteristics of Physical Activities in Daily Life in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **171**, 972–977 (2005).
135. Watz, H. *et al.* Extrapulmonary Effects of Chronic Obstructive Pulmonary Disease on Physical Activity. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **177**, 743–751 (2008).
136. Préfaut, C. & Ninot, G. Dysfonction musculaire et altération des performances musculaires. in *La Réhabilitation du malade respiratoire chronique* (Elsevier Masson SAS, 2009).
137. Polkey, M. I. & Moxham, J. Attacking the disease spiral in chronic obstructive pulmonary disease. *Clin. Med.* **6**, 190–196 (2006).
138. Shrikrishna, D. *et al.* Quadriceps wasting and physical inactivity in patients with COPD. *Eur. Respir. J.* **40**, 1115–1122 (2012).
139. Ramon, M. A. *et al.* The dyspnoea–inactivity vicious circle in COPD: development and external validation of a conceptual model. *Eur. Respir. J.* **52**, 1800079 (2018).
140. Hartman, J. E., Boezen, H. M., de Greef, M. H., Bossenbroek, L. & ten Hacken, N. H. Consequences of physical inactivity in chronic obstructive pulmonary disease. *Expert Rev. Respir. Med.* **4**, 735–745 (2010).
141. Couillard, A. & Préfaut, C. L'électrostimulation dans la réhabilitation des patients BPCO sévères : pertinence ou facétie ? *Rev. Mal. Respir.* **27**, 113–124 (2010).
142. Murton, A. J. & Greenhaff, P. L. Physiological control of muscle mass in humans during resistance exercise, disuse and rehabilitation: *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* **13**, 249–254 (2010).
143. Paddon-Jones, D. *et al.* Essential Amino Acid and Carbohydrate Supplementation Ameliorates Muscle Protein Loss in Humans during 28 Days Bedrest. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **89**, 4351–4358 (2004).
144. Symons, T. B., Sheffield-Moore, M., Chinkes, D. L., Ferrando, A. A. & Paddon-Jones, D. Artificial gravity maintains skeletal muscle protein synthesis during 21 days of simulated microgravity. *J. Appl. Physiol.* **107**, 34–38 (2009).
145. Boer, M. D. D. *et al.* The temporal responses of protein synthesis, gene expression and cell signalling in human quadriceps muscle and patellar tendon to disuse. *J. Physiol.* **585**, 241–251 (2007).
146. Abadi, A. *et al.* Limb Immobilization Induces a Coordinate Down-Regulation of Mitochondrial and Other Metabolic Pathways in Men and Women. *PLOS ONE* **4**, e6518 (2009).
147. Suetta, C. *et al.* Aging Affects the Transcriptional Regulation of Human Skeletal Muscle Disuse Atrophy. *PLOS ONE* **7**, e51238 (2012).
148. Brocca, L. *et al.* The time course of the adaptations of human muscle proteome to bed rest and the underlying mechanisms. *J. Physiol.* **590**, 5211–5230 (2012).
149. Borina, E., Pellegrino, M. A., D'Antona, G. & Bottinelli, R. Myosin and actin content of human skeletal muscle fibers following 35 days bed rest. *Scand. J. Med. Sci. Sports* **20**, 65–73 (2010).
150. Senf, S. M., Dodd, S. L. & Judge, A. R. FOXO signaling is required for disuse muscle atrophy and is directly regulated by Hsp70. *Am. J. Physiol.-Cell Physiol.* **298**, C38–C45 (2009).
151. Wu, C.-L., Kandarian, S. C. & Jackman, R. W. Identification of Genes that Elicit Disuse Muscle Atrophy via the Transcription Factors p50 and Bcl-3. *PLOS ONE* **6**, e16171 (2011).

152. Sandri, M. *et al.* Foxo Transcription Factors Induce the Atrophy-Related Ubiquitin Ligase Atrogin-1 and Cause Skeletal Muscle Atrophy. *Cell* **117**, 399–412 (2004).
153. Decramer, M. Pulmonary rehabilitation 2007: From bench to practice and back. *Clin. Invest. Med.* E312–E318 (2008) doi:10.25011/cim.v31i5.4882.
154. Gouzi, F. & Hayot, M. Peut-on encore parler de patients BPCO “non répondeurs” à la réhabilitation ? Évolution d’un concept. *MISE AU POINT* 6 (2013).
155. Ferreira, I. M., Brooks, D., White, J. & Goldstein, R. Nutritional supplementation for stable chronic obstructive pulmonary disease. *Cochrane Database Syst. Rev.* (2012) doi:10.1002/14651858.CD000998.pub3.
156. Creutzberg, E. C., Wouters, E. F. M., Vanderhoven-Augustin, I. M. L., Dentener, M. A. & Schols, A. M. W. J. Disturbances in Leptin Metabolism Are Related to Energy Imbalance during Acute Exacerbations of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **162**, 1239–1245 (2000).
157. Vermeeren, M. A., Schols, A. M. & Wouters, E. F. Effects of an acute exacerbation on nutritional and metabolic profile of patients with COPD. *Eur. Respir. J.* **10**, 2264–2269 (1997).
158. Wolfe, R. R. The underappreciated role of muscle in health and disease. *Am. J. Clin. Nutr.* **84**, 475–482 (2006).
159. Kao, C. C. *et al.* Resting energy expenditure and protein turnover are increased in patients with severe chronic obstructive pulmonary disease. *Metabolism.* **60**, 1449–1455 (2011).
160. Schols, A. M., Buurman, W. A., Staal van den Brekel, A. J., Dentener, M. A. & Wouters, E. F. Evidence for a relation between metabolic derangements and increased levels of inflammatory mediators in a subgroup of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax* **51**, 819–824 (1996).
161. Schols, A. M., Fredrix, E. W., Soeters, P. B., Westerterp, K. R. & Wouters, E. F. Resting energy expenditure in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Clin. Nutr.* **54**, 983–987 (1991).
162. Baarends, E. M., Schols, A. M., Akkermans, M. A. & Wouters, E. F. Decreased mechanical efficiency in clinically stable patients with COPD. *Thorax* **52**, 981–986 (1997).
163. Layec, G., Haseler, L. J., Hoff, J. & Richardson, R. S. Evidence that a higher ATP cost of muscular contraction contributes to the lower mechanical efficiency associated with COPD: preliminary findings. *Am. J. Physiol.-Regul. Integr. Comp. Physiol.* **300**, R1142–R1147 (2011).
164. Green, H. J. *et al.* Altered metabolic and transporter characteristics of vastus lateralis in chronic obstructive pulmonary disease. *J. Appl. Physiol.* **105**, 879–886 (2008).
165. Serres, I., Hayot, M., Préfaut, C. & Mercier, J. Skeletal muscle abnormalities in patients with COPD: contribution to exercise intolerance. *Med. Sci. Sports Exerc.* **30**, 1019–1027 (1998).
166. Gosker, H. R., Hesselink, M. K. C., Duimel, H., Ward, K. A. & Schols, A. M. W. J. Reduced mitochondrial density in the vastus lateralis muscle of patients with COPD. *Eur. Respir. J.* **30**, 73–79 (2007).
167. Maltais, F. *et al.* Oxidative enzyme activities of the vastus lateralis muscle and the functional status in patients with COPD. *Thorax* **55**, 848–853 (2000).
168. Rabinovich, R. A. *et al.* Mitochondrial dysfunction in COPD patients with low body mass index. *Eur. Respir. J.* **29**, 643–650 (2007).
169. Remels, A. H. V. *et al.* TNF- α impairs regulation of muscle oxidative phenotype: implications for cachexia? *FASEB J.* **24**, 5052–5062 (2010).
170. Mitch, W. E. Mechanisms accelerating muscle atrophy in catabolic diseases. *Trans. Am. Clin. Climatol. Assoc.* **111**, 258–270 (2000).
171. Rhen, T. & Cidlowski, J. A. Antiinflammatory Action of Glucocorticoids — New Mechanisms for Old Drugs. *N. Engl. J. Med.* **353**, 1711–1723 (2005).

172. Hu, Z., Wang, H., Lee, I. H., Du, J. & Mitch, W. E. Endogenous glucocorticoids and impaired insulin signaling are both required to stimulate muscle wasting under pathophysiological conditions in mice. *J. Clin. Invest.* **119**, 3059–3069 (2009).
173. Schakman, O. *et al.* Role of Akt/GSK-3 β / β -Catenin Transduction Pathway in the Muscle Anti-Atrophy Action of Insulin-Like Growth Factor-I in Glucocorticoid-Treated Rats. *Endocrinology* **149**, 3900–3908 (2008).
174. Schakman, O. *et al.* Insulin-Like Growth Factor-I Gene Transfer by Electroporation Prevents Skeletal Muscle Atrophy in Glucocorticoid-Treated Rats. *Endocrinology* **146**, 1789–1797 (2005).
175. Gilson, H. *et al.* Myostatin Gene Deletion Prevents Glucocorticoid-Induced Muscle Atrophy. *Endocrinology* **148**, 452–460 (2007).
176. Kumari, R., Willing, L. B., Jefferson, L. S., Simpson, I. A. & Kimball, S. R. REDD1 (regulated in development and DNA damage response 1) expression in skeletal muscle as a surrogate biomarker of the efficiency of glucocorticoid receptor blockade. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **412**, 644–647 (2011).
177. Shimizu, N. *et al.* Crosstalk between Glucocorticoid Receptor and Nutritional Sensor mTOR in Skeletal Muscle. *Cell Metab.* **13**, 170–182 (2011).
178. Schols, A. M. W. J. *et al.* Dose dependent increased mortality risk in COPD patients treated with oral glucocorticoids. *Eur. Respir. J.* **17**, 337–342 (2001).
179. Vestbo, J. *et al.* Global Strategy for the Diagnosis, Management, and Prevention of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **187**, 347–365 (2013).
180. Chen, X.-Q., Dong, J., Niu, C.-Y., Fan, J.-M. & Du, J.-Z. Effects of Hypoxia on Glucose, Insulin, Glucagon, and Modulation by Corticotropin-Releasing Factor Receptor Type 1 in the Rat. *Endocrinology* **148**, 3271–3278 (2007).
181. Favier, F. B. *et al.* Downregulation of Akt/mammalian target of rapamycin pathway in skeletal muscle is associated with increased REDD1 expression in response to chronic hypoxia. *Am. J. Physiol.-Regul. Integr. Comp. Physiol.* **298**, R1659–R1666 (2010).
182. Tashkin, D. P. *et al.* A 4-Year Trial of Tiotropium in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. <http://dx.doi.org.gate2.inist.fr/10.1056/NEJMoa0805800> https://www-nejm-org.gate2.inist.fr/doi/10.1056/NEJMoa0805800?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori%3Arid%3Acrossref.org&rfr_dat=cr_pub%3Dwww.ncbi.nlm.nih.gov (2009) doi:10.1056/NEJMoa0805800.
183. Martinez, F. J. *et al.* Predictors of Mortality in Patients with Emphysema and Severe Airflow Obstruction. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **173**, 1326–1334 (2006).
184. Kent, B. D., Mitchell, P. D. & McNicholas, W. T. Hypoxemia in patients with COPD: cause, effects, and disease progression. *Int. J. Chron. Obstruct. Pulmon. Dis.* **6**, 199–208 (2011).
185. Hoppeler, H. *et al.* II. Morphological Adaptations of Human Skeletal Muscle to Chronic Hypoxia*. *Int. J. Sports Med.* **11**, S3–S9 (1990).
186. Westerterp-Plantenga, M. S. *et al.* Appetite at “high altitude” [Operation Everest III (Comex-’97)]: a simulated ascent of Mount Everest. *J. Appl. Physiol.* **87**, 391–399 (1999).
187. Ambrosini, G., Nath, A. K., Sierra-Honigmann, M. R. & Flores-Riveros, J. Transcriptional Activation of the Human Leptin Gene in Response to Hypoxia INVOLVEMENT OF HYPOXIA-INDUCIBLE FACTOR 1. *J. Biol. Chem.* **277**, 34601–34609 (2002).
188. Favier, F. B., Britto, F. A., Freyssenet, D. G., Bigard, X. A. & Benoit, H. HIF-1-driven skeletal muscle adaptations to chronic hypoxia: molecular insights into muscle physiology. *Cell. Mol. Life Sci.* **72**, 4681–4696 (2015).
189. Takabatake, N. *et al.* A Novel Pathophysiologic Phenomenon in Cachexic Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **163**, 1314–1319 (2001).

190. Liu, L. *et al.* Hypoxia-Induced Energy Stress Regulates mRNA Translation and Cell Growth. *Mol. Cell* **21**, 521–531 (2006).
191. D’Hulst, G. *et al.* Effect of acute environmental hypoxia on protein metabolism in human skeletal muscle. *Acta Physiol.* **208**, 251–264 (2013).
192. Caron, M.-A., Thériault, M.-E., Paré, M.-È., Maltais, F. & Debigaré, R. Hypoxia alters contractile protein homeostasis in L6 myotubes. *FEBS Lett.* **583**, 1528–1534 (2009).
193. Chaudhary, P., Sharma, Y. K., Sharma, S., Singh, S. N. & Suryakumar, G. High altitude mediated skeletal muscle atrophy: Protective role of curcumin. *Biochimie* **156**, 138–147 (2019).
194. Chaudhary, P. *et al.* Chronic hypobaric hypoxia mediated skeletal muscle atrophy: role of ubiquitin–proteasome pathway and calpains. *Mol. Cell. Biochem.* **364**, 101–113 (2012).
195. Jatta, K. *et al.* Overexpression of von Hippel-Lindau protein in skeletal muscles of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *J. Clin. Pathol.* **62**, 70–76 (2009).
196. de Theije, C. C. *et al.* Hypoxia impairs adaptation of skeletal muscle protein turnover- and AMPK signaling during fasting-induced muscle atrophy. *PLOS ONE* **13**, e0203630 (2018).
197. Park, C. W. *et al.* BNIP3 is degraded by ULK1-dependent autophagy via MTORC1 and AMPK. *Autophagy* **9**, 345–360 (2013).
198. Baechler, B. L., Bloemberg, D. & Quadriatero, J. Mitophagy regulates mitochondrial network signaling, oxidative stress, and apoptosis during myoblast differentiation. *Autophagy* **15**, 1606–1619 (2019).
199. Song, P. & Zou, M.-H. Roles of Reactive Oxygen Species in Physiology and Pathology. in *Atherosclerosis* (eds. Wang, H. & Patterson, C.) 379–392 (John Wiley & Sons, Inc, 2015). doi:10.1002/9781118828533.ch30.
200. Powers, SK. & Jackson, MJ. Exercise-Induced Oxidative Stress: Cellular Mechanisms and Impact on Muscle Force Production. *Physiol. Rev.* **88**, 1243–1276 (2008).
201. Puente-Maestu, L. *et al.* Abnormal mitochondrial function in locomotor and respiratory muscles of COPD patients. *Eur. Respir. J.* **33**, 1045–1052 (2009).
202. Pomiès, P. *et al.* Reduced myotube diameter, atrophic signalling and elevated oxidative stress in cultured satellite cells from COPD patients. *J. Cell. Mol. Med.* **19**, 175–186 (2015).
203. Pomiès, P. *et al.* Involvement of the FoxO1/MuRF1/Atrogin-1 Signaling Pathway in the Oxidative Stress-Induced Atrophy of Cultured Chronic Obstructive Pulmonary Disease Myotubes. *PLOS ONE* **11**, e0160092 (2016).
204. Koechlin, C. *et al.* Does Oxidative Stress Alter Quadriceps Endurance in Chronic Obstructive Pulmonary Disease? *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **169**, 1022–1027 (2004).
205. Koechlin, C. *et al.* Hypoxaemia enhances peripheral muscle oxidative stress in chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax* **60**, 834–841 (2005).
206. Barreiro, E. *et al.* Chronic endurance exercise induces quadriceps nitrosative stress in patients with severe COPD. *Thorax* **64**, 13–19 (2009).
207. Rodriguez, D. A. *et al.* Muscle and blood redox status after exercise training in severe COPD patients. *Free Radic. Biol. Med.* **52**, 88–94 (2012).
208. Allaire, J. *et al.* Lipofuscin accumulation in the vastus lateralis muscle in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Muscle Nerve* **25**, 383–389 (2002).
209. Barreiro, E. *et al.* Oxidative Stress and Respiratory Muscle Dysfunction in Severe Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **171**, 1116–1124 (2005).
210. Barreiro, E., Gea, J., Matar, G. & Hussain, S. N. A. Expression and Carbonylation of Creatine Kinase in the Quadriceps Femoris Muscles of Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **33**, 636–642 (2005).
211. Barreiro, E., Gea, J., Corominas, J. M. & Hussain, S. N. A. Nitric Oxide Synthases and Protein Oxidation in the Quadriceps Femoris of Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **29**, 771–778 (2003).

212. Mashinchian, O., Pisconti, A., Le Moal, E. & Bentzinger, C. F. The Muscle Stem Cell Niche in Health and Disease. in *Current Topics in Developmental Biology* vol. 126 23–65 (Elsevier, 2018).
213. Yang, W. & Hu, P. Skeletal muscle regeneration is modulated by inflammation. *J. Orthop. Transl.* **13**, 25–32 (2018).
214. Tidball, J. G. Regulation of muscle growth and regeneration by the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* **17**, 165–178 (2017).
215. Wehling-Henricks, M. *et al.* Arginine Metabolism by Macrophages Promotes Cardiac and Muscle Fibrosis in mdx Muscular Dystrophy. *PLOS ONE* **5**, e10763 (2010).
216. Gordon, B. S., Kelleher, A. R. & Kimball, S. R. Regulation of Muscle Protein Synthesis and the Effects of Catabolic States. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **45**, 2147–2157 (2013).
217. Harris, J. Autophagy and cytokines. *Cytokine* **56**, 140–144 (2011).
218. Reid, M. B. & Li, Y.-P. Tumor necrosis factor- α and muscle wasting: a cellular perspective. *Respir. Res.* **2**, 269–272 (2001).
219. Späte, U. & Schulze, P. C. Proinflammatory cytokines and skeletal muscle: *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* **7**, 265–269 (2004).
220. Suematsu Nobuhiro *et al.* Oxidative Stress Mediates Tumor Necrosis Factor- α -Induced Mitochondrial DNA Damage and Dysfunction in Cardiac Myocytes. *Circulation* **107**, 1418–1423 (2003).
221. Mariappan, N., Elks, C. M., Fink, B. & Francis, J. TNF-induced mitochondrial damage: a link between mitochondrial complex I activity and left ventricular dysfunction. *Free Radic. Biol. Med.* **46**, 462–470 (2009).
222. Taivassalo, T. & Hussain, S. N. A. Contribution of the Mitochondria to Locomotor Muscle Dysfunction in Patients With COPD. *Chest* **149**, 1302–1312 (2016).
223. Kuilman, T. *et al.* Oncogene-Induced Senescence Relayed by an Interleukin-Dependent Inflammatory Network. *Cell* **133**, 1019–1031 (2008).
224. Tspirpanlis, G. Cellular Senescence and Inflammation: A Noteworthy Link. *Blood Purif.* **28**, 12–14 (2009).
225. Ferrari, A. *et al.* Rhabdomyosarcoma in adults. A retrospective analysis of 171 patients treated at a single institution. *Cancer* **98**, 571–580 (2003).
226. García-Prat, L. *et al.* Autophagy maintains stemness by preventing senescence. *Nature* **529**, 37–42 (2016).
227. Nussbaumer-Ochsner, Y. & Rabe, K. F. Systemic Manifestations of COPD. *Chest* **139**, 165–173 (2011).
228. Wouters, E. F. M., Groenewegen, K. H., Dentener, M. A. & Vernooy, J. H. J. Systemic Inflammation in Chronic Obstructive Pulmonary Disease: The Role of Exacerbations. *Proc. Am. Thorac. Soc.* **4**, 626–634 (2007).
229. Agustí, A., Morlá, M., Sauleda, J., Saus, C. & Busquets, X. NF- κ B activation and iNOS upregulation in skeletal muscle of patients with COPD and low body weight. *Thorax* **59**, 483–487 (2004).
230. Cai, D. *et al.* IKK β /NF- κ B Activation Causes Severe Muscle Wasting in Mice. *Cell* **119**, 285–298 (2004).
231. Eid, A. A. *et al.* Inflammatory Response and Body Composition in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **164**, 1414–1418 (2001).
232. Lacasse, Y., Cates, C. J., McCarthy, B. & Welsh, E. J. This Cochrane Review is closed: deciding what constitutes enough research and where next for pulmonary rehabilitation in COPD. *Cochrane Database Syst. Rev.* (2015) doi:10.1002/14651858.ED000107.

233. Puhan, M. A., Gimeno-Santos, E., Cates, C. J. & Troosters, T. Pulmonary rehabilitation following exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Cochrane Database Syst. Rev.* (2016) doi:10.1002/14651858.CD005305.pub4.
234. Spruit, M. A. *et al.* An Official American Thoracic Society/European Respiratory Society Statement: Key Concepts and Advances in Pulmonary Rehabilitation. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **188**, e13–e64 (2013).
235. Coventry, P. A. Does pulmonary rehabilitation reduce anxiety and depression in chronic obstructive pulmonary disease?: *Curr. Opin. Pulm. Med.* **15**, 143–149 (2009).
236. Light, R. W., Merrill, E. J., Despars, J. A., Gordon, G. H. & Mutalipassi, L. R. Prevalence of Depression and Anxiety in Patients with COPD. *Chest* **87**, 35–38 (1985).
237. de Voogd, J. N., Sanderman, R., Postema, K., van Sonderen, E. & Wempe, J. B. Relationship between anxiety and dyspnea on exertion in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Anxiety Stress Coping* **24**, 439–449 (2011).
238. Yohannes, A. M., Baldwin, R. C. & Connolly, M. J. Depression and anxiety in elderly patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Age Ageing* **35**, 457–459 (2006).
239. Comment mettre en œuvre la réhabilitation respiratoire pour les patients ayant une bronchopneumopathie chronique obstructive? *Haute Autorité de Santé* https://www.has-sante.fr/jcms/c_1744735/fr/comment-mettre-en-oeuvre-la-rehabilitation-respiratoire-pour-les-patients-ayant-une-bronchopneumopathie-chronique-obstructive (2014).
240. Franssen, F. M. E., Broekhuizen, R., Janssen, P. P., Wouters, E. F. M. & Schols, A. M. W. J. Effects of Whole-Body Exercise Training on Body Composition and Functional Capacity in Normal-Weight Patients With COPD. *Chest* **125**, 2021–2028 (2004).
241. Bernard, S. *et al.* Aerobic and Strength Training in Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **159**, 896–901 (1999).
242. Pison, C. M. *et al.* Multimodal nutritional rehabilitation improves clinical outcomes of malnourished patients with chronic respiratory failure: a randomised controlled trial. *Thorax* **66**, 953–960 (2011).
243. Bool, C. van de *et al.* A randomized clinical trial investigating the efficacy of targeted nutrition as adjunct to exercise training in COPD. *J. Cachexia Sarcopenia Muscle* **8**, 748–758 (2017).
244. Gouzi, F. *et al.* Additional Effects of Nutritional Antioxidant Supplementation on Peripheral Muscle during Pulmonary Rehabilitation in COPD Patients: A Randomized Controlled Trial. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* <https://www.hindawi.com/journals/omcl/2019/5496346/> (2019) doi:10.1155/2019/5496346.
245. Casaburi, R., Kukafka, D., Cooper, C. B., Witek, T. J. & Kesten, S. Improvement in Exercise Tolerance With the Combination of Tiotropium and Pulmonary Rehabilitation in Patients With COPD. *Chest* **127**, 809–817 (2005).
246. Emtner, M., Porszasz, J., Burns, M., Somfay, A. & Casaburi, R. Benefits of Supplemental Oxygen in Exercise Training in Nonhypoxemic Chronic Obstructive Pulmonary Disease Patients. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **168**, 1034–1042 (2003).
247. Creutzberg, E. C., Wouters, E. F. M., Mostert, R., Pluymers, R. J. & Schols, A. M. W. J. A Role for Anabolic Steroids in the Rehabilitation of Patients With COPD? *. *Chest* **124**, 1733–1742 (2003).
248. Hirai, D. M. *et al.* Oral N-acetylcysteine and exercise tolerance in mild chronic obstructive pulmonary disease. *J. Appl. Physiol.* **122**, 1351–1361 (2017).
249. Travaline, J. M. *et al.* Effect of N -Acetylcysteine on Human Diaphragm Strength and Fatigability. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **156**, 1567–1571 (1997).
250. Doorduyn, J. *et al.* The Calcium Sensitizer Levosimendan Improves Human Diaphragm Function. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **185**, 90–95 (2012).

251. van Hees, H. W. H., Dekhuijzen, P. N. R. & Heunks, L. M. A. Levosimendan Enhances Force Generation of Diaphragm Muscle from Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **179**, 41–47 (2009).
252. Nagaya, N. *et al.* Treatment of Cachexia With Ghrelin in Patients With COPD. *Chest* **128**, 1187–1193 (2005).
253. Polkey, M. I. *et al.* Activin Type II Receptor Blockade for Treatment of Muscle Depletion in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. A Randomized Trial. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **199**, 313–320 (2018).
254. Rooks, D. *et al.* Treatment of Sarcopenia with Bimagrumab: Results from a Phase II, Randomized, Controlled, Proof-of-Concept Study. *J. Am. Geriatr. Soc.* **65**, 1988–1995 (2017).
255. Rabe, K. F. *et al.* Roflumilast—an oral anti-inflammatory treatment for chronic obstructive pulmonary disease: a randomised controlled trial. **366**, 9 (2005).
256. Barreiro, E. *et al.* The phosphodiesterase-4 inhibitor roflumilast reverts proteolysis in skeletal muscle cells of patients with COPD cachexia. *J. Appl. Physiol.* **125**, 287–303 (2018).
257. Neder, J. A. Home based neuromuscular electrical stimulation as a new rehabilitative strategy for severely disabled patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Thorax* **57**, 333–337 (2002).
258. Bourjeily-Habr, G. Randomised controlled trial of transcutaneous electrical muscle stimulation of the lower extremities in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax* **57**, 1045–1049 (2002).
259. Abdellaoui, A. *et al.* Skeletal muscle effects of electrostimulation after COPD exacerbation: a pilot study. *Eur. Respir. J.* **38**, 781–788 (2011).
260. Maddocks, M. *et al.* Neuromuscular electrical stimulation to improve exercise capacity in patients with severe COPD: a randomised double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Respir. Med.* **4**, 27–36 (2016).
261. Vivodtzev, I. *et al.* Improvement in Quadriceps Strength and Dyspnea in Daily Tasks After 1 Month of Electrical Stimulation in Severely Deconditioned and Malnourished COPD. *Chest* **129**, 1540–1548 (2006).
262. Jones, S. *et al.* Neuromuscular electrical stimulation for muscle weakness in adults with advanced disease. *Cochrane Database Syst. Rev.* (2016) doi:10.1002/14651858.CD009419.pub3.
263. Bustamante, V., de Santa María, E. L., Gorostiza, A., Jiménez, U. & Gáldiz, J. B. Muscle training with repetitive magnetic stimulation of the quadriceps in severe COPD patients. *Respir. Med.* **104**, 237–245 (2010).
264. Bustamante, V. *et al.* Redox balance following magnetic stimulation training in the quadriceps of patients with severe COPD. *Free Radic. Res.* **42**, 939–948 (2008).
265. Troosters, T., Gosselink, R. & Decramer, M. Exercise Training in COPD: How to Distinguish Responders from Nonresponders: *J. Cardpulm. Rehabil.* **21**, 10–17 (2001).
266. Gouzi, F. *et al.* Impaired training-induced adaptation of blood pressure in COPD patients: implication of the muscle capillary bed. *Int. J. Chron. Obstruct. Pulmon. Dis.* **Volume 11**, 2349–2357 (2016).
267. Gouzi, F. *et al.* Blunted muscle angiogenic training-response in COPD patients versus sedentary controls. *Eur. Respir. J.* **41**, 806–814 (2013).
268. Güell, M.-R. *et al.* Benefits of Long-Term Pulmonary Rehabilitation Maintenance Program in Patients with Severe Chronic Obstructive Pulmonary Disease. Three-Year Follow-up. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **195**, 622–629 (2017).
269. Constantin, D. *et al.* Skeletal muscle molecular responses to resistance training and dietary supplementation in COPD. *Thorax* **68**, 625–633 (2013).

270. Deacon, S. J. *et al.* Randomized Controlled Trial of Dietary Creatine as an Adjunct Therapy to Physical Training in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **178**, 233–239 (2008).
271. Woods, J. A., Wheeler, J. S., Finch, C. K. & Pinner, N. A. Corticosteroids in the treatment of acute exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Int. J. Chron. Obstruct. Pulmon. Dis.* **9**, 421–430 (2014).
272. Vogelmeier, C. F. Systemic steroids in COPD—the beauty and the beast. *Respir. Res.* **15**, 38 (2014).
273. Desai, C. S., Martin, S. S. & Blumenthal, R. S. Non-cardiovascular effects associated with statins. *BMJ* **349**, g3743–g3743 (2014).
274. Ferreira, I. M. *et al.* The Influence of 6 Months of Oral Anabolic Steroids on Body Mass and Respiratory Muscles in Undernourished COPD Patients. *Chest* **114**, 19–28 (1998).
275. Burdet, L., de MURALT, B., Schutz, Y., Pichard, C. & Fitting, J.-W. Administration of Growth Hormone to Underweight Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease: A Prospective, Randomized, Controlled Study. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **156**, 1800–1806 (1997).
276. Miki, K. *et al.* Randomized, dose-finding trial of ghrelin treatment for chronic respiratory failure: Randomized dose-finding trial of ghrelin. *Clin. Respir. J.* **11**, 496–505 (2017).
277. Garrod, R. Supplemental oxygen during pulmonary rehabilitation in patients with COPD with exercise hypoxaemia. *Thorax* **55**, 539–543 (2000).
278. Héraud, N., Préfaut, C., Durand, F. & Varray, A. Does correction of exercise-induced desaturation by O₂ always improve exercise tolerance in COPD? A preliminary study. *Respir. Med.* **102**, 1276–1286 (2008).
279. Dal Corso, S. *et al.* Skeletal muscle structure and function in response to electrical stimulation in moderately impaired COPD patients. *Respir. Med.* **101**, 1236–1243 (2007).
280. Vernooij, J. H. *et al.* Local and Systemic Inflammation in Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease: Soluble Tumor Necrosis Factor Receptors Are Increased in Sputum. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **166**, 1218–1224 (2002).
281. Agustí, A. & Celli, B. Natural history of COPD: gaps and opportunities. *ERJ Open Res.* **3**, (2017).
282. Agustí, A. *et al.* Persistent Systemic Inflammation is Associated with Poor Clinical Outcomes in COPD: A Novel Phenotype. *PLoS ONE* **7**, e37483 (2012).
283. Ceelen, J. J. M. *et al.* Altered protein turnover signaling and myogenesis during impaired recovery of inflammation-induced muscle atrophy in emphysematous mice. *Sci. Rep.* **8**, 10761 (2018).
284. Vlahos, R. & Bozinovski, S. Preclinical murine models of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Eur. J. Pharmacol.* **759**, 265–271 (2015).
285. Jobse, B. N. *et al.* Detection of Lung Dysfunction Using Ventilation and Perfusion SPECT in a Mouse Model of Chronic Cigarette Smoke Exposure. *J. Nucl. Med.* **54**, 616–623 (2013).
286. Muñoz-Cánoves, P., Scheele, C., Pedersen, B. K. & Serrano, A. L. Interleukin-6 myokine signaling in skeletal muscle: a double-edged sword? *Febs J.* **280**, 4131–4148 (2013).
287. Pinto-Plata, V. *et al.* Inflammatory and repair serum biomarker pattern. Association to clinical outcomes in COPD. *Respir. Res.* **13**, 71 (2012).
288. Yende, S. Inflammatory markers are associated with ventilatory limitation and muscle dysfunction in obstructive lung disease in well functioning elderly subjects. *Thorax* **61**, 10–16 (2005).
289. Takabatake, N. *et al.* The Relationship between Chronic Hypoxemia and Activation of the Tumor Necrosis Factor- α System in Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **161**, 1179–1184 (2000).

290. Flores, E. A. *et al.* Infusion of tumor necrosis factor/cachectin promotes muscle catabolism in the rat. A synergistic effect with interleukin 1. *J. Clin. Invest.* **83**, 1614–1622 (1989).
291. Langen, R. C. J., Schols, A. M. W. J., Kelders, M. C. J. M., Wouters, E. F. M. & Janssen-Heininger, Y. M. W. Inflammatory cytokines inhibit myogenic differentiation through activation of nuclear factor- κ B. *FASEB J.* **15**, 1169–1180 (2001).
292. Tracey, K. J. Cachectin/tumor necrosis factor induces cachexia, anemia, and inflammation. *J. Exp. Med.* **167**, 1211–1227 (1988).
293. de Godoy, I., Donahoe, M., Calhoun, W. J., Mancino, J. & Rogers, R. M. Elevated TNF-alpha production by peripheral blood monocytes of weight-losing COPD patients. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **153**, 633–637 (1996).
294. Lazaar, A. L. *et al.* No TWEAK for COPD. *Eur. Respir. J.* **42**, 1142–1144 (2013).
295. Zhang, Y.-B., Zuo, H.-Y., Tian, D.-H., Ouyang, X.-H. & Wang, X.-A. Correlation between peripheral skeletal muscle functions and the stable phase of COPD in older patients. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* **22**, 5317–5326 (2018).
296. Lu, J.-J., Wang, Q., Xie, L. H., Zhang, Q. & Sun, S. H. Tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis regulates quadriceps muscle atrophy and fiber-type alteration in a rat model of chronic obstructive pulmonary disease. *Tob. Induc. Dis.* **15**, 43 (2017).
297. Langen, R. C. J. *et al.* Tumor necrosis factor-alpha inhibits myogenic differentiation through MyoD protein destabilization. *FASEB J.* **18**, 227–237 (2004).
298. Zhou, L. *et al.* Over-expression of nuclear factor- κ B family genes and inflammatory molecules is related to chronic obstructive pulmonary disease. *Int. J. Chron. Obstruct. Pulmon. Dis.* **13**, 2131–2138 (2018).
299. Spruit, M. A. Muscle force during an acute exacerbation in hospitalised patients with COPD and its relationship with CXCL8 and IGF-I. *Thorax* **58**, 752–756 (2003).
300. Broekhuizen, R. Raised CRP levels mark metabolic and functional impairment in advanced COPD. *Thorax* **61**, 17–22 (2005).
301. Fogarty, A. W., Jones, S., Britton, J. R., Lewis, S. A. & McKeever, T. M. Systemic inflammation and decline in lung function in a general population: a prospective study. *Thorax* **62**, 515–520 (2007).
302. Alahmari, A. D. *et al.* Physical activity and exercise capacity in patients with moderate COPD exacerbations. *Eur. Respir. J.* **48**, 340–349 (2016).
303. Bozinovski, S. *et al.* Serum Amyloid A Is a Biomarker of Acute Exacerbations of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **177**, 269–278 (2008).
304. Zhang, L. *et al.* IL-6 and Serum Amyloid A Synergy Mediates Angiotensin II-Induced Muscle Wasting. *J. Am. Soc. Nephrol.* **20**, 604–612 (2009).
305. Passey, S. L., Bozinovski, S., Vlahos, R., Anderson, G. P. & Hansen, M. J. Serum Amyloid A Induces Toll-Like Receptor 2-Dependent Inflammatory Cytokine Expression and Atrophy in C2C12 Skeletal Muscle Myotubes. *PLoS One* **11**, e0146882–e0146882 (2016).
306. Schaefer, L. Complexity of Danger: The Diverse Nature of Damage-associated Molecular Patterns. *J. Biol. Chem.* **289**, 35237–35245 (2014).
307. Taylor, A. E. *et al.* Defective macrophage phagocytosis of bacteria in COPD. *Eur. Respir. J.* **35**, 1039–1047 (2010).
308. Menon, M. K. *et al.* Inflammatory and Satellite Cells in the Quadriceps of Patients With COPD and Response to Resistance Training. *Chest* **142**, 1134–1142 (2012).
309. Tidball, J. G. Inflammatory processes in muscle injury and repair. *Am. J. Physiol.-Regul. Integr. Comp. Physiol.* **288**, R345–R353 (2005).
310. Shaykhiev, R. & Crystal, R. G. Innate Immunity and Chronic Obstructive Pulmonary Disease: A Mini-Review. *Gerontology* **59**, 481–489 (2013).

311. Deyhle, M. R. & Hyldahl, R. D. The Role of T Lymphocytes in Skeletal Muscle Repair From Traumatic and Contraction-Induced Injury. *Front. Physiol.* **9**, 768 (2018).
312. Aldonyte, R., Jansson, L., Piitulainen, E. & Janciauskiene, S. Circulating monocytes from healthy individuals and COPD patients. *Respir. Res.* **4**, 11 (2003).
313. Lim, J. P. *et al.* Monocyte chemoattractant protein-1: a proinflammatory cytokine elevated in sarcopenic obesity. *Clin. Interv. Aging* **10**, 605–609 (2015).
314. Wouters, E. F. M., Reynaert, N. L., Dentener, M. A. & Vernooij, J. H. J. Systemic and Local Inflammation in Asthma and Chronic Obstructive Pulmonary Disease: Is There a Connection? *Proc. Am. Thorac. Soc.* **6**, 638–647 (2009).
315. Sutton, M. & Sharpe, N. Left Ventricular Remodeling After Myocardial Infarction. *Circulation* 2981–2988 (2000) doi:doi.org/10.1161/01.CIR.101.25.2981.
316. Herman, J. P. *et al.* Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical stress response. *Compr. Physiol.* **6**, 603–621 (2016).
317. Wright, R. J. Stress and acquired glucocorticoid resistance: A relationship hanging in the balance. *J. Allergy Clin. Immunol.* **123**, 831–832 (2009).
318. Núñez, B. *et al.* Lack of Correlation Between Pulmonary and Systemic Inflammation Markers in Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease: A Simultaneous, Two-Compartmental Analysis. *Arch. Bronconeumol. Engl. Ed.* **52**, 361–367 (2016).
319. Sinden, N. J. & Stockley, R. A. Systemic inflammation and comorbidity in COPD: a result of ‘overspill’ of inflammatory mediators from the lungs? Review of the evidence. *Thorax* **65**, 930–936 (2010).
320. Goldsmith, C. A., Imrich, A., Danaee, H., Ning, Y. Y. & Kobzik, L. Analysis of air pollution particulate-mediated oxidant stress in alveolar macrophages. *J. Toxicol. Environ. Health A* **54**, 529–545 (1998).
321. Zemans, R. L. *et al.* Multiple biomarkers predict disease severity, progression and mortality in COPD. *Respir. Res.* **18**, 117 (2017).
322. Baltimore, D., Boldin, M. P., O’Connell, R. M., Rao, D. S. & Taganov, K. D. MicroRNAs: new regulators of immune cell development and function. *Nat. Immunol.* **9**, 839–845 (2008).
323. Sonkoly, E., Stähle, M. & Pivarcsi, A. MicroRNAs and immunity: Novel players in the regulation of normal immune function and inflammation. *Semin. Cancer Biol.* **18**, 131–140 (2008).
324. Barreiro, E. & Gea, J. Epigenetics and muscle dysfunction in chronic obstructive pulmonary disease. *Transl. Res. J. Lab. Clin. Med.* **165**, 61–73 (2015).
325. Barreiro, E. The role of MicroRNAs in COPD muscle dysfunction and mass loss: implications on the clinic. *Expert Rev. Respir. Med.* **10**, 1011–1022 (2016).
326. Barreiro, E. & Sznajder, J. I. Epigenetic regulation of muscle phenotype and adaptation: a potential role in COPD muscle dysfunction. *J. Appl. Physiol.* **114**, 1263–1272 (2013).
327. Georgantas, R. W. *et al.* Inhibition of Myogenic MicroRNAs 1, 133, and 206 by Inflammatory Cytokines Links Inflammation and Muscle Degeneration in Adult Inflammatory Myopathies. *Arthritis Rheumatol.* **66**, 1022–1033 (2014).
328. Barreiro, E. *et al.* Differences in micro-RNA expression profile between vastus lateralis samples and myotubes in COPD cachexia. *J. Appl. Physiol.* **126**, 403–412 (2018).
329. Donaldson, A. *et al.* Increased skeletal muscle-specific microRNA in the blood of patients with COPD. *Thorax* **68**, 1140–1149 (2013).
330. Puig-Vilanova, E. *et al.* Quadriceps muscle weakness and atrophy are associated with a differential epigenetic profile in advanced COPD. *Clin. Sci.* **128**, 905–921 (2015).
331. Farre-Garros, R. *et al.* Quadriceps miR-542-3p and -5p are elevated in COPD and reduce function by inhibiting ribosomal and protein synthesis. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md 1985* **126**, 1514–1524 (2019).

332. Garros, R. F. *et al.* MicroRNA-542 Promotes Mitochondrial Dysfunction and SMAD Activity and Is Elevated in Intensive Care Unit–acquired Weakness. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **196**, 1422–1433 (2017).
333. Bolton, C. E. *et al.* Cellular protein breakdown and systemic inflammation are unaffected by pulmonary rehabilitation in COPD. *Thorax* **62**, 109–114 (2007).
334. Mauro, A. SATELLITE CELL OF SKELETAL MUSCLE FIBERS. *J. Cell Biol.* **9**, 493–495 (1961).
335. Almada, A. E. & Wagers, A. J. Molecular circuitry of stem cell fate in skeletal muscle regeneration, ageing and disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **17**, 267–279 (2016).
336. Bentzinger, C. F., Wang, Y. X. & Rudnicki, M. A. Building Muscle: Molecular Regulation of Myogenesis. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **4**, a008342–a008342 (2012).
337. Brack, A. S. & Rando, T. A. Tissue-Specific Stem Cells: Lessons from the Skeletal Muscle Satellite Cell. *Cell Stem Cell* **10**, 504–514 (2012).
338. Ostrovidov, S. *et al.* Skeletal Muscle Tissue Engineering: Methods to Form Skeletal Myotubes and Their Applications. *Tissue Eng. Part B Rev.* **20**, 403–436 (2014).
339. Gaster, M. The diabetic phenotype is preserved in myotubes established from type 2 diabetic subjects: a critical appraisal. *APMIS* **127**, 3–26 (2019).
340. Barro, M. *et al.* Myoblasts from affected and non-affected FSHD muscles exhibit morphological differentiation defects. *J. Cell. Mol. Med.* **14**, 275–289 (2010).
341. Tidball, J. G., Dorshkind, K. & Wehling-Henricks, M. Shared signaling systems in myeloid cell-mediated muscle regeneration. *Development* **141**, 1184–1196 (2014).
342. Baudy, A. R., Saxena, N., Gordish, H., Hoffman, E. P. & Nagaraju, K. A Robust In Vitro Screening Assay to Identify NF- κ B Inhibitors for Inflammatory Muscle Diseases. *Int. Immunopharmacol.* **9**, 1209–1214 (2009).
343. Cho, Y. S., Kim, C. H. & Cheon, H. G. Cell-based assay for screening 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase 1 inhibitors. *Anal. Biochem.* **392**, 110–116 (2009).
344. Owens, J., Moreira, K. & Bain, G. Characterization of primary human skeletal muscle cells from multiple commercial sources. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* **49**, 695–705 (2013).
345. Henry, R. R., Abrams, L., Nikoulina, S. & Ciaraldi, T. P. Insulin Action and Glucose Metabolism in Nondiabetic Control and NIDDM Subjects. **44**, 11 (1995).
346. Sarabia, V., Lam, L., Burdett, E., Leiter, L. A. & Klip, A. Glucose transport in human skeletal muscle cells in culture. Stimulation by insulin and metformin. <https://www-jci-org.gate2.inist.fr/articles/view/116005/pdf> (1992) doi:10.1172/JCI116005.
347. Bouzakri, K. *et al.* Reduced Activation of Phosphatidylinositol-3 Kinase and Increased Serine 636 Phosphorylation of Insulin Receptor Substrate-1 in Primary Culture of Skeletal Muscle Cells From Patients With Type 2 Diabetes. *Diabetes* **52**, 1319–1325 (2003).
348. Gaster, M., Petersen, I. M., Højlund, K., Poulsen, P. B. & Beck-Nielsen, H. The diabetic phenotype is conserved in myotubes established from diabetic subjects: evidence for primary defects in glucose transport and glycogen synthase activity. *Diabetes* **51**, 921–927 (2002).
349. Horsley, V., Jansen, K. M., Mills, S. T. & Pavlath, G. K. IL-4 Acts as a Myoblast Recruitment Factor during Mammalian Muscle Growth. *Cell* **113**, 483–494 (2003).
350. Jacquemin, V., Butler-Browne, G. S., Furling, D. & Mouly, V. IL-13 mediates the recruitment of reserve cells for fusion during IGF-1-induced hypertrophy of human myotubes. *J. Cell Sci.* **120**, 670–681 (2007).
351. Kneppers, A. *et al.* A novel in vitro model for the assessment of postnatal myonuclear accretion. *Skelet. Muscle* **8**, 4 (2018).
352. Prokopchuk, O., Liu, Y., Wang, L., Wirth, K. & Schmidt, D. Skeletal muscle IL-4, IL-4R α , IL-13 and IL-13R α 1 expression and response to strength training. **9** (2007).
353. Chaillou, T. & Lanner, J. T. Regulation of myogenesis and skeletal muscle regeneration: effects of oxygen levels on satellite cell activity. *FASEB J.* **30**, 3929–3941 (2016).

354. Richardson, R. S. *et al.* Human skeletal muscle intracellular oxygenation: the impact of ambient oxygen availability. *J. Physiol.* **571**, 415–424 (2006).
355. Lees, S. J., Childs, T. E. & Booth, F. W. p21Cip1 expression is increased in ambient oxygen, compared to estimated physiological (5%) levels in rat muscle precursor cell culture. *Cell Prolif.* **41**, 193–207 (2008).
356. Chakravarthy, M. V., Spangenburg, E. E. & Booth, F. W. Culture in low levels of oxygen enhances in vitro proliferation potential of satellite cells from old skeletal muscles: *Cell. Mol. Life Sci.* **58**, 1150–1158 (2001).
357. Csete, M. *et al.* Oxygen-mediated regulation of skeletal muscle satellite cell proliferation and adipogenesis in culture. *J. Cell. Physiol.* **189**, 189–196 (2001).
358. Majmundar, A. J. *et al.* O₂ Regulates Skeletal Muscle Progenitor Differentiation through Phosphatidylinositol 3-Kinase/AKT Signaling. *Mol. Cell. Biol.* **32**, 36–49 (2012).
359. Martin, N. R. W. *et al.* Hypoxia Impairs Muscle Function and Reduces Myotube Size in Tissue Engineered Skeletal Muscle. *J. Cell. Biochem.* **118**, 2599–2605 (2017).
360. Wang, C. *et al.* Hypoxia Inhibits Myogenic Differentiation through p53 Protein-dependent Induction of Bhlhe40 Protein. *J. Biol. Chem.* **290**, 29707–29716 (2015).
361. Carlo, A. D. *et al.* Hypoxia Inhibits Myogenic Differentiation through Accelerated MyoD Degradation. **8** (2004).
362. Gustafsson, M. V. *et al.* Hypoxia Requires Notch Signaling to Maintain the Undifferentiated Cell State. *Dev. Cell* **9**, 617–628 (2005).
363. Launay, T. *et al.* Blunting effect of hypoxia on the proliferation and differentiation of human primary and rat L6 myoblasts is not counteracted by Epo. *Cell Prolif.* **43**, 1–8 (2010).
364. Sente, T., Van Berendoncks, A. M., Fransen, E., Vrints, C. J. & Hoymans, V. Y. Tumor necrosis factor- α impairs adiponectin signalling, mitochondrial biogenesis, and myogenesis in primary human myotubes cultures. *Am. J. Physiol.-Heart Circ. Physiol.* **310**, H1164–H1175 (2016).
365. Rodriguez-Miguel, P. *et al.* Acute Tetrahydrobiopterin Improves Endothelial Function in Patients With COPD. *Chest* **154**, 597–606 (2018).
366. Chanon, S. *et al.* Proteolysis inhibition by hibernating bear serum leads to increased protein content in human muscle cells. *Sci. Rep.* **8**, 5525 (2018).
367. Shainberg, A. & Burstein, M. Decrease of acetylcholine receptor synthesis in muscle cultures by electrical stimulation. *Nature* **264**, 368 (1976).
368. Naumann, K. & Pette, D. Effects of chronic stimulation with different impulse patterns on the expression of myosin isoforms in rat myotube cultures. *Differentiation* **55**, 203–211 (1994).
369. Nedachi, T., Fujita, H. & Kanzaki, M. Contractile C2C12 myotube model for studying exercise-inducible responses in skeletal muscle. *Am. J. Physiol.-Endocrinol. Metab.* **295**, E1191–E1204 (2008).
370. Egan, B. & Zierath, J. R. Exercise Metabolism and the Molecular Regulation of Skeletal Muscle Adaptation. *Cell Metab.* **17**, 162–184 (2013).
371. Brown, A. E., Jones, D. E., Walker, M. & Newton, J. L. Abnormalities of AMPK Activation and Glucose Uptake in Cultured Skeletal Muscle Cells from Individuals with Chronic Fatigue Syndrome. *PLOS ONE* **10**, e0122982 (2015).
372. Lambernd, S. *et al.* Contractile activity of human skeletal muscle cells prevents insulin resistance by inhibiting pro-inflammatory signalling pathways. *Diabetologia* **55**, 1128–1139 (2012).
373. Nikolić, N. *et al.* Electrical pulse stimulation of cultured skeletal muscle cells as a model for in vitro exercise - possibilities and limitations. *Acta Physiol.* **220**, 310–331 (2017).
374. Nikolić, N. *et al.* Electrical Pulse Stimulation of Cultured Human Skeletal Muscle Cells as an In Vitro Model of Exercise. *PLOS ONE* **7**, e33203 (2012).

375. Barnes, P. J. Inflammatory mechanisms in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *J. Allergy Clin. Immunol.* **138**, 16–27 (2016).
376. Miyatake, S., Bilan, P. J., Pillon, N. J. & Klip, A. Contracting C2C12 myotubes release CCL2 in an NF- κ B-dependent manner to induce monocyte chemoattraction. *Am. J. Physiol.-Endocrinol. Metab.* **310**, E160–E170 (2015).
377. Feng, Y. Z. *et al.* Myotubes from lean and severely obese subjects with and without type 2 diabetes respond differently to an in vitro model of exercise. *Am. J. Physiol.-Cell Physiol.* **308**, C548–C556 (2015).
378. Orfanos, Z. *et al.* Breaking sarcomeres by in vitro exercise. *Sci. Rep.* **6**, 19614 (2016).
379. Orozco-Levi, M. *et al.* Injury of Peripheral Muscles in Smokers with Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Ultrastruct. Pathol.* **36**, 228–238 (2012).
380. Puig-Vilanova, E. *et al.* Oxidative stress, redox signaling pathways, and autophagy in cachectic muscles of male patients with advanced COPD and lung cancer. *Free Radic. Biol. Med.* **79**, 91–108 (2015).
381. Rahman, M. *et al.* Reactive Oxygen Species Regulation of Autophagy in Skeletal Muscles. *Antioxid. Redox Signal.* **20**, 443–459 (2014).
382. Rodríguez, D. A. *et al.* Plasma metabolic profile in COPD patients: effects of exercise and endurance training. *Metabolomics* **8**, 508–516 (2012).
383. Bergström, J. Muscle electrolytes in man determined by neutron activation analysis on needle biopsy specimens. *Scand. J. Clin. Lab. Investig. Engl. Vol: 14: Suppl. 68*, (1962).
384. Shanely, R. A. *et al.* Human Skeletal Muscle Biopsy Procedures Using the Modified Bergström Technique. *J. Vis. Exp. JoVE* (2014) doi:10.3791/51812.
385. Hayot, M. *et al.* Skeletal muscle microbiopsy: a validation study of a minimally invasive technique. *Eur. Respir. J.* **25**, 431–440 (2005).
386. Raschke, S., Eckardt, K., Bjørklund Holven, K., Jensen, J. & Eckel, J. Identification and Validation of Novel Contraction-Regulated Myokines Released from Primary Human Skeletal Muscle Cells. *PLoS ONE* **8**, (2013).
387. Fulster, S. *et al.* Muscle wasting in patients with chronic heart failure: results from the studies investigating co-morbidities aggravating heart failure (SICA-HF). *Eur. Heart J.* **34**, 512–519 (2013).
388. Shachar, S. S., Williams, G. R., Muss, H. B. & Nishijima, T. F. Prognostic value of sarcopenia in adults with solid tumours: A meta-analysis and systematic review. *Eur. J. Cancer* **57**, 58–67 (2016).
389. Rymarz, A., Gibińska, J., Zajbt, M., Piechota, W. & Niemczyk, S. Low lean tissue mass can be a predictor of one-year survival in hemodialysis patients. *Ren. Fail.* **40**, 231–237 (2018).
390. Maltais, F. *et al.* An Official American Thoracic Society/European Respiratory Society Statement: Update on Limb Muscle Dysfunction in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **189**, e15–e62 (2014).
391. McKenna, C. F. & Fry, C. S. Altered satellite cell dynamics accompany skeletal muscle atrophy during chronic illness, disuse, and aging. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* **20**, 447–452 (2017).
392. Tierney, M. T. *et al.* STAT3 signaling controls satellite cell expansion and skeletal muscle repair. *Nat. Med.* **20**, 1182–1186 (2014).
393. Arentson-Lantz, E. J., English, K. L., Paddon-Jones, D. & Fry, C. S. Fourteen days of bed rest induces a decline in satellite cell content and robust atrophy of skeletal muscle fibers in middle-aged adults. *J. Appl. Physiol.* **120**, 965–975 (2016).
394. Hayot, M. Skeletal muscle microbiopsy: a validation study of a minimally invasive technique. *Eur. Respir. J.* **25**, 431–440 (2005).

395. van der Wal, E. *et al.* Large-Scale Expansion of Human iPSC-Derived Skeletal Muscle Cells for Disease Modeling and Cell-Based Therapeutic Strategies. *Stem Cell Rep.* **10**, 1975–1990 (2018).
396. Gstraunthaler, G. Alternatives to the use of fetal bovine serum: serum-free cell culture. *ALTEX-Altern. Anim. Exp.* **20**, 275–281 (2003).
397. Khodabukus, A. & Baar, K. The Effect of Serum Origin on Tissue Engineered Skeletal Muscle Function: S ERUM A ND E NGINEERED M USCLE F UNCTION. *J. Cell. Biochem.* **115**, 2198–2207 (2014).
398. Zhu, C.-H. *et al.* Cellular senescence in human myoblasts is overcome by human telomerase reverse transcriptase and cyclin-dependent kinase 4: consequences in aging muscle and therapeutic strategies for muscular dystrophies. *Aging Cell* **6**, 515–523 (2007).
399. Chanon, S. *et al.* Proteolysis inhibition by hibernating bear serum leads to increased protein content in human muscle cells. *Sci. Rep.* **8**, (2018).
400. Gouzi, F. *et al.* Oxidative stress regulates autophagy in cultured muscle cells of patients with chronic obstructive pulmonary disease: GOUZI ET AL. *J. Cell. Physiol.* (2018) doi:10.1002/jcp.26868.
401. van Hees, H. W. *et al.* Plasma from septic shock patients induces loss of muscle protein. *Crit. Care* **15**, R233 (2011).
402. Kalampouka, I., van Bekhoven, A. & Elliott, B. T. Differing Effects of Younger and Older Human Plasma on C2C12 Myocytes in Vitro. *Front. Physiol.* **9**, (2018).
403. George, T., Velloso, C. P., Alsharidah, M., Lazarus, N. R. & Harridge, S. D. R. Sera from young and older humans equally sustain proliferation and differentiation of human myoblasts. *Exp. Gerontol.* **45**, 875–881 (2010).
404. Corrick, K. L. *et al.* Serum from human burn victims impairs myogenesis and protein synthesis in primary myoblasts. *Front. Physiol.* **6**, (2015).
405. Vitucci, D. *et al.* Serum from differently exercised subjects induces myogenic differentiation in LHCN-M2 human myoblasts. *J. Sports Sci.* **36**, 1630–1639 (2018).
406. Lawson, M. A. & Purslow, P. P. Differentiation of myoblasts in serum-free media: effects of modified media are cell line-specific. *Cells Tissues Organs* **167**, 130–137 (2000).
407. van der Valk, J. *et al.* The humane collection of fetal bovine serum and possibilities for serum-free cell and tissue culture. *Toxicol. In Vitro* **18**, 1–12 (2004).
408. Baker, M. *Reproducibility: Respect your cells!* (Nature Publishing Group, 2016).
409. Pomiès, P. *et al.* Reduced myotube diameter, atrophic signalling and elevated oxidative stress in cultured satellite cells from COPD patients. *J. Cell. Mol. Med.* **19**, 175–186 (2015).
410. Barreiro, E. *et al.* The phosphodiesterase-4 inhibitor roflumilast reverts proteolysis in skeletal muscle cells of patients with COPD cachexia. *J. Appl. Physiol.* **125**, 287–303 (2018).
411. Pietrangelo, T. *et al.* Molecular basis of the myogenic profile of aged human skeletal muscle satellite cells during differentiation. *Exp. Gerontol.* **44**, 523–531 (2009).
412. Pomiès, P. *et al.* Involvement of the FoxO1/MuRF1/Atrogin-1 signaling pathway in the oxidative stress-induced atrophy of cultured chronic obstructive pulmonary disease myotubes. *PLoS One* **11**, e0160092 (2016).
413. Pavlidou, T. *et al.* Regulation of myoblast differentiation by metabolic perturbations induced by metformin. *PLoS One* **12**, e0182475 (2017).
414. Podbregar, M., Lainscak, M., Prelovsek, O. & Mars, T. Cytokine Response of Cultured Skeletal Muscle Cells Stimulated with Proinflammatory Factors Depends on Differentiation Stage. *Sci. World J.* **2013**, 1–8 (2013).
415. Vogelmeier, C. F. *et al.* Global Strategy for the Diagnosis, Management, and Prevention of Chronic Obstructive Lung Disease 2017 Report. GOLD Executive Summary. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **195**, 557–582 (2017).

416. Perez, T. *et al.* Modified Medical Research Council scale vs Baseline Dyspnea Index to evaluate dyspnea in chronic obstructive pulmonary disease. *Int. J. Chron. Obstruct. Pulmon. Dis.* 1663 (2015) doi:10.2147/COPD.S82408.
417. Nuttall, F. Q. Body Mass Index: Obesity, BMI, and Health. *Nutr. Today* **50**, 117–128 (2015).
418. Kudsk, K. A., Munoz-del-Rio, A., Busch, R. A., Kight, C. E. & Schoeller, D. A. Stratification of Fat-Free Mass Index Percentiles for Body Composition Based on National Health and Nutrition Examination Survey III Bioelectric Impedance Data. *J. Parenter. Enter. Nutr.* **41**, 249–257 (2017).
419. Celli, B. *et al.* The 6-Minute-Walk Distance Test as a Chronic Obstructive Pulmonary Disease Stratification Tool. Insights from the COPD Biomarker Qualification Consortium. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **194**, 1483–1493 (2016).
420. Barro, M. *et al.* Myoblasts from affected and non-affected FSHD muscles exhibit morphological differentiation defects. *J. Cell. Mol. Med.* **14**, 275–289 (2010).
421. Aarts, E., Verhage, M., Veenliet, J. V., Dolan, C. V. & van der Sluis, S. A solution to dependency: using multilevel analysis to accommodate nested data. *Nat. Neurosci.* **17**, 491–496 (2014).
422. Bland, J. M. & Altman, D. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *The lancet* **327**, 307–310 (1986).
423. Giavarina, D. Understanding Bland Altman analysis. *Biochem. Medica* **25**, 141–151 (2015).
424. Kwist, K., Bridges, W. C. & Burg, K. J. L. The effect of cell passage number on osteogenic and adipogenic characteristics of D1 cells. *Cytotechnology* **68**, 1661–1667 (2016).
425. Fukada, S. *et al.* Molecular Signature of Quiescent Satellite Cells in Adult Skeletal Muscle. *Stem Cells* **25**, 2448–2459 (2007).
426. Rajan, S. *et al.* Analysis of early C2C12 myogenesis identifies stably and differentially expressed transcriptional regulators whose knock-down inhibits myoblast differentiation. *Physiol. Genomics* **44**, 183–197 (2012).
427. Kneppers, A. *et al.* A novel in vitro model for the assessment of postnatal myonuclear accretion. *Skelet. Muscle* **8**, (2018).
428. Millay, D. P. *et al.* Myomaker is a membrane activator of myoblast fusion and muscle formation. *Nature* **499**, 301–305 (2013).
429. Pollet, T. V., Stulp, G., Henzi, S. P. & Barrett, L. Taking the aggravation out of data aggregation: A conceptual guide to dealing with statistical issues related to the pooling of individual-level observational data: Data Aggregation and the Ecological Fallacy. *Am. J. Primatol.* **77**, 727–740 (2015).
430. Saini, A. *et al.* Asymmetric cellular responses in primary human myoblasts using sera of different origin and specification. *PLOS ONE* **13**, e0192384 (2018).
431. Conboy, I. M., Conboy, M. J. & Rebo, J. Systemic problems: a perspective on stem cell aging and rejuvenation. *Aging* **7**, 754 (2015).
432. Barnes, P. J. & Celli, B. R. Systemic manifestations and comorbidities of COPD. *Eur. Respir. J.* **33**, 1165–1185 (2009).
433. Hernández, N. *et al.* Dual morphometrical changes of the deltoid muscle in patients with COPD. *Respir. Physiol. Neurobiol.* **134**, 219–229 (2003).
434. Agustí, A. *et al.* Persistent Systemic Inflammation is Associated with Poor Clinical Outcomes in COPD: A Novel Phenotype. *PLoS ONE* **7**, e37483 (2012).
435. Pinto-Plata *et al.* Inflammatory and repair serum biomarker pattern. Association to clinical outcomes in COPD. (2012).
436. Zemans, R. L. *et al.* Multiple biomarkers predict disease severity, progression and mortality in COPD. *Respir. Res.* **18**, (2017).

437. Byun, M. K., Cho, E. N., Chang, J., Ahn, C. M. & Kim, H. J. Sarcopenia correlates with systemic inflammation in COPD. *Int. J. Chron. Obstruct. Pulmon. Dis.* **Volume 12**, 669–675 (2017).
438. Agustí, A. & Faner, R. Systemic Inflammation and Comorbidities in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Proc. Am. Thorac. Soc.* **9**, 43–46 (2012).
439. Martinis, M. D., Franceschi, C., Monti, D. & Ginaldi, L. Inflamm-aging and lifelong antigenic load as major determinants of ageing rate and longevity. *FEBS Lett.* **579**, 2035–2039 (2005).
440. Leitner, L. M., Wilson, R. J., Yan, Z. & Gödecke, A. Reactive Oxygen Species/Nitric Oxide Mediated Inter-Organ Communication in Skeletal Muscle Wasting Diseases. *Antioxid. Redox Signal.* **26**, 700–717 (2017).
441. Abdulai, R. M. *et al.* Deterioration of Limb Muscle Function during Acute Exacerbation of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **197**, 433–449 (2017).
442. Pitta, F. *et al.* Physical activity and hospitalization for exacerbation of COPD. *Chest* **129**, 536–544 (2006).
443. Rinkinen, J. *et al.* The Systemic Effect of Burn Injury and Trauma on Muscle and Bone Mass and Composition. *Plast. Reconstr. Surg.* **136**, 612e–623e (2015).
444. Corrick, K. L. *et al.* Serum from human burn victims impairs myogenesis and protein synthesis in primary myoblasts. *Front. Physiol.* **6**, (2015).
445. Lin, Y. *et al.* PGC-1 α is associated with C2C12 Myoblast differentiation. *Cent. Eur. J. Biol.* **9**, 1030–1036 (2014).
446. Ju, C.-R. & Chen, R.-C. Serum myostatin levels and skeletal muscle wasting in chronic obstructive pulmonary disease. *Respir. Med.* **106**, 102–108 (2012).
447. Forbes, D. *et al.* Myostatin auto-regulates its expression by feedback loop through Smad7 dependent mechanism. *J. Cell. Physiol.* **206**, 264–272 (2006).
448. Kim, B. *et al.* PGC1 α induced by reactive oxygen species contributes to chemoresistance of ovarian cancer cells. *Oncotarget* **8**, 60299–60311 (2017).
449. Zhang, J.-C. *et al.* TGF- β /BAMBI pathway dysfunction contributes to peripheral Th17/Treg imbalance in chronic obstructive pulmonary disease. *Sci. Rep.* **6**, 31911 (2016).
450. Onichtchouk, D. *et al.* Silencing of TGF- β signalling by the pseudoreceptor BAMBI. *Nature* **401**, 480 (1999).
451. Zhang, Q. *et al.* BAMBI Promotes C2C12 Myogenic Differentiation by Enhancing Wnt/ β -Catenin Signaling. *Int. J. Mol. Sci.* **16**, 17734–17745 (2015).
452. van Hees, H. W. *et al.* Plasma from septic shock patients induces loss of muscle protein. *Crit. Care* **15**, R233 (2011).
453. Li, Y.-P. & Reid, M. B. NF- κ B mediates the protein loss induced by TNF- α in differentiated skeletal muscle myotubes. *Am. J. Physiol.-Regul. Integr. Comp. Physiol.* **279**, R1165–R1170 (2000).
454. Samuel, V. T. & Shulman, G. I. Integrating Mechanisms for Insulin Resistance: Common Threads and Missing Links. *Cell* **148**, 852–871 (2012).
455. Cohen, S. *et al.* Chronic stress, glucocorticoid receptor resistance, inflammation, and disease risk. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, 5995 (2012).
456. Spruit, M. A. *et al.* COPD and exercise: does it make a difference? *Breathe Sheff. Engl.* **12**, e38-49 (2016).
457. Girdhar, A., Agarwal, P. & Singh, A. Pulmonary Rehabilitation in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Cardiorespir. Fit.* (2018) doi:10.5772/intechopen.81742.
458. Porszasz, J. *et al.* Exercise Training Decreases Ventilatory Requirements and Exercise-Induced Hyperinflation at Submaximal Intensities in Patients With COPD. *Chest* **128**, 2025–2034 (2005).
459. Maltais, F. *et al.* Skeletal muscle adaptation to endurance training in patients with chronic obstructive pulmonary disease. **154**, 6 (1996).

460. Foglio, K. *et al.* Long-term effectiveness of pulmonary rehabilitation in patients with chronic airway obstruction. *Eur. Respir. J.* **13**, 125–132 (1999).
461. Bestall, J. C. *et al.* Longitudinal trends in exercise capacity and health status after pulmonary rehabilitation in patients with COPD. *Respir. Med.* **97**, 173–180 (2003).
462. Spencer, L. M., Alison, J. A. & McKeough, Z. J. Maintaining benefits following pulmonary rehabilitation: a randomised controlled trial. *Eur. Respir. J.* **35**, 571–577 (2010).
463. Bouzid, M. A., Filaire, E., Matran, R., Robin, S. & Fabre, C. Lifelong Voluntary Exercise Modulates Age-Related Changes in Oxidative Stress. *Int. J. Sports Med.* **39**, 21–28 (2018).
464. Simioni, C. *et al.* Oxidative stress: role of physical exercise and antioxidant nutraceuticals in adulthood and aging. *Oncotarget* **9**, 17181–17198 (2018).
465. Devries, M. C. *et al.* Endurance training without weight loss lowers systemic, but not muscle, oxidative stress with no effect on inflammation in lean and obese women. *Free Radic. Biol. Med.* **45**, 503–511 (2008).
466. Rabinovich, R. A. *et al.* Training Depletes Muscle Glutathione in Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease and Low Body Mass Index. *Respiration* **73**, 757–761 (2006).
467. Rabinovich, R. A. *et al.* Reduced Muscle Redox Capacity after Endurance Training in Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **164**, 1114–1118 (2001).
468. Mercken, E. M. *et al.* Rehabilitation Decreases Exercise-induced Oxidative Stress in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **172**, 994–1001 (2005).
469. Petersen, A. M. W. & Pedersen, B. K. The anti-inflammatory effect of exercise. *J. Appl. Physiol.* **98**, 1154–1162 (2005).
470. Campbell, P. T. *et al.* A Yearlong Exercise Intervention Decreases CRP among Obese Postmenopausal Women. *Med. Sci. Sports Exerc.* **41**, (2009).
471. Petersen, A. M. W., Mittendorfer, B., Magkos, F., Iversen, M. & Pedersen, B. K. Physical activity counteracts increased whole-body protein breakdown in chronic obstructive pulmonary disease patients. *Scand. J. Med. Sci. Sports* **18**, 557–564 (2008).
472. Londhe, P. & Davie, J. K. Gamma interferon modulates myogenesis through the major histocompatibility complex class II transactivator, CIITA. *Mol. Cell. Biol.* **31**, 2854–2866 (2011).
473. Londhe, P. & Davie, J. K. Interferon- γ Resets Muscle Cell Fate by Stimulating the Sequential Recruitment of JARID2 and PRC2 to Promoters To Repress Myogenesis. *Sci. Signal.* **6**, ra107 (2013).
474. Chen, S.-E. *et al.* Role of TNF- α signaling in regeneration of cardiotoxin-injured muscle. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **289**, C1179–C1187 (2005).
475. Holland, A. E. *et al.* An official European Respiratory Society/ American Thoracic Society technical standard: field walking tests in chronic respiratory disease. **19** (2014).
476. Couillard, A. *et al.* Exercise-induced Quadriceps Oxidative Stress and Peripheral Muscle Dysfunction in Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **167**, 1664–1669 (2003).
477. Koechlin, C. *et al.* Does systemic inflammation trigger local exercise-induced oxidative stress in COPD? *Eur. Respir. J.* **23**, 538–544 (2004).
478. Milan, G. *et al.* Regulation of autophagy and the ubiquitin–proteasome system by the FoxO transcriptional network during muscle atrophy. *Nat. Commun.* **6**, 6670 (2015).
479. Kneppers, A. E. M. *et al.* Distinct skeletal muscle molecular responses to pulmonary rehabilitation in chronic obstructive pulmonary disease: a cluster analysis. *J. Cachexia Sarcopenia Muscle* **10**, 311–322 (2019).
480. Phillips, S. M., Tipton, K. D., Ferrando, A. A. & Wolfe, R. R. Resistance training reduces the acute exercise-induced increase in muscle protein turnover. *Am. J. Physiol.-Endocrinol. Metab.* **276**, E118–E124 (1999).

481. Kumar, V., Atherton, P., Smith, K. & Rennie, M. J. Human muscle protein synthesis and breakdown during and after exercise. *J. Appl. Physiol.* **106**, 2026–2039 (2009).
482. Tipton, K. D., Hamilton, D. L. & Gallagher, I. J. Assessing the Role of Muscle Protein Breakdown in Response to Nutrition and Exercise in Humans. *Sports Med.* **48**, 53–64 (2018).
483. Engelen, M. P. K. J., Wouters, E. F. M., Deutz, N. E. P., Does, J. D. & Schols, A. M. W. J. Effects of Exercise on Amino Acid Metabolism in Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **163**, 859–864 (2001).
484. Jagoe, R. T. & Engelen, M. P. K. J. Muscle wasting and changes in muscle protein metabolism in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur. Respir. J.* **22**, 52s–63s (2003).
485. Morton, R. W., McGlory, C. & Phillips, S. M. Nutritional interventions to augment resistance training-induced skeletal muscle hypertrophy. *Front. Physiol.* **6**, (2015).
486. Ju, C., Chen, M., Zhang, J., Lin, Z. & Chen, R. Higher Plasma Myostatin Levels in Cor Pulmonale Secondary to Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *PLoS ONE* **11**, (2016).
487. Troosters, T. *et al.* Resistance Training Prevents Deterioration in Quadriceps Muscle Function During Acute Exacerbations of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **181**, 1072–1077 (2010).
488. Lewis, M. I. *et al.* Skeletal muscle adaptations to testosterone and resistance training in men with COPD. *J. Appl. Physiol.* **103**, 1299–1310 (2007).
489. Li, J. *et al.* miR-29b contributes to multiple types of muscle atrophy. *Nat. Commun.* **8**, 1–15 (2017).
490. Zhang, G. *et al.* Tumor induces muscle wasting in mice through releasing extracellular Hsp70 and Hsp90. *Nat. Commun.* **8**, 1–16 (2017).
491. Hacker, S. *et al.* Elevated HSP27, HSP70 and HSP90 alpha in chronic obstructive pulmonary disease: markers for immune activation and tissue destruction. *Clin. Lab.* **55**, 31–40 (2009).
492. Pedersen, B. K. & Febbraio, M. Muscle-derived interleukin-6—A possible link between skeletal muscle, adipose tissue, liver, and brain. *Brain. Behav. Immun.* **19**, 371–376 (2005).
493. Aas, V. *et al.* Are cultured human myotubes far from home? *Cell Tissue Res.* **354**, 671–682 (2013).
494. Burch, N. *et al.* Electric Pulse Stimulation of Cultured Murine Muscle Cells Reproduces Gene Expression Changes of Trained Mouse Muscle. *PLoS ONE* **5**, (2010).
495. Pinho, R. A. *et al.* Oxidative stress in chronic obstructive pulmonary disease patients submitted to a rehabilitation program. *Respir. Med.* **101**, 1830–1835 (2007).
496. Nguyen, T. *et al.* Effect of chronic obstructive pulmonary disease on calcium pump ATPase expression in human diaphragm. *J. Appl. Physiol.* **98**, 2004–2010 (2005).
497. Tu, M. K., Levin, J. B., Hamilton, A. M. & Borodinsky, L. N. Calcium signaling in skeletal muscle development, maintenance and regeneration. *Cell Calcium* **59**, 91–97 (2016).
498. Hindi, S. M., Tajrishi, M. M. & Kumar, A. Signaling Mechanisms in Mammalian Myoblast Fusion. *Sci. Signal.* **6**, re2 (2013).
499. Constantin, B., Cognard, C. & Raymond, G. Myoblast fusion requires cytosolic calcium elevation but not activation of voltage-dependent calcium channels. *Cell Calcium* **19**, 365–374 (1996).
500. Liu, J.-H. *et al.* Acceleration of human myoblast fusion by depolarization: graded Ca²⁺ signals involved. *Development* **130**, 3437–3446 (2003).
501. Eftimie, R., Brenner, H. R. & Buonanno, A. Myogenin and MyoD join a family of skeletal muscle genes regulated by electrical activity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **88**, 1349–1353 (1991).
502. Laker, R. C. *et al.* Exercise Prevents Maternal High-Fat Diet–Induced Hypermethylation of the Pgc-1 α Gene and Age-Dependent Metabolic Dysfunction in the Offspring. *Diabetes* **63**, 1605–1611 (2014).

503. Barrès, R. *et al.* Acute Exercise Remodels Promoter Methylation in Human Skeletal Muscle. *Cell Metab.* **15**, 405–411 (2012).
504. Zwetsloot, K. A., Laye, M. J. & Booth, F. W. Novel epigenetic regulation of skeletal muscle myosin heavy chain genes. Focus on “Differential epigenetic modifications of histones at the myosin heavy chain genes in fast and slow skeletal muscle fibers and in response to muscle unloading”. *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* **297**, C1–C3 (2009).
505. Wu, D.-D. *et al.* The potential for targeted rewriting of epigenetic marks in COPD as a new therapeutic approach. *Pharmacol. Ther.* **182**, 1–14 (2018).
506. Tarum, J., Folkesson, M., Atherton, P. J. & Kadi, F. Electrical pulse stimulation: an in vitro exercise model for the induction of human skeletal muscle cell hypertrophy. A proof-of-concept study. *Exp. Physiol.* **102**, 1405–1413 (2017).
507. Dong, J. *et al.* Inhibition of myostatin in mice improves insulin sensitivity via irisin-mediated cross talk between muscle and adipose tissues. *Int. J. Obes.* **40**, 434–442 (2016).
508. Pomiès, P. *et al.* Reduced myotube diameter, atrophic signalling and elevated oxidative stress in cultured satellite cells from COPD patients. *J. Cell. Mol. Med.* **19**, 175–186 (2015).
509. Leal, L. G., Lopes, M. A. & Batista, M. L. J. Physical Exercise-Induced Myokines and Muscle-Adipose Tissue Crosstalk: A Review of Current Knowledge and the Implications for Health and Metabolic Diseases. *Front. Physiol.* **9**, (2018).
510. Febbraio, M. A. & Pedersen, B. K. Contraction-Induced Myokine Production and Release: Is Skeletal Muscle an Endocrine Organ?: *Exerc. Sport Sci. Rev.* **33**, 114–119 (2005).
511. Miller, M. R. *et al.* Standardisation of spirometry. *Eur. Respir. J.* **26**, 319–338 (2005).
512. Janssen, I., Heymsfield, S. B., Baumgartner, R. N. & Ross, R. Estimation of skeletal muscle mass by bioelectrical impedance analysis. *J. Appl. Physiol.* **89**, 465–471 (2000).
513. ATS Committee on Proficiency Standards for Clinical Pulmonary Function Laboratories. ATS statement: guidelines for the six-minute walk test. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **166**, 111–117 (2002).